

Université de Sherbrooke

Contrôle et stabilité des profils d'épissage alternatif

Par
Alexandre Cloutier
Programme de microbiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph. D.)
en microbiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Déposée le 18 mai 2017

Membres du jury d'évaluation
Pr. Benoit Chabot, département de microbiologie et infectiologie
Pr. Brendan Bell, département de microbiologie et infectiologie
Pr. Éric Massé, département de biochimie
Pr. Marc-Étienne Huot, département de biologie moléculaire, faculté de médecine,
Université de Laval

© Alexandre Cloutier, 2017

*Je dédie cette thèse
À ma très chère famille,
À ma marraine Monique qui ne pourra voir
malheureusement le fruit de ces efforts,
Et à mi vida, mi corazon, celle qui aura réussi à conquérir mon cœur,
ma chère chérie*

Pour savoir où l'on va, il faut savoir d'où l'on vient

Anonyme

RÉSUMÉ

Contrôle et instabilité des profils d'épissage alternatif

Par Alexandre Cloutier
Programme de microbiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en microbiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La première partie de cette thèse traite du contrôle de l'épissage alternatif du pré-ARNm encodant le régulateur apoptotique Bcl-x et permettant la production de deux isoformes aux fonctions opposées par l'utilisation alternative de sites d'épissage 5'. Mon étude de ce gène s'est portée sur l'élément SB1 qui est une région répressive pour l'utilisation du site d'épissage de Bcl-xS et un point de convergence de la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC) et de la cascade de réponse des dommages à l'ADN (DDR). La dissection par mutagenèse de cet élément a permis d'identifier des sous-régions régulatrices. Des essais de chromatographie d'ARN utilisant des portions de SB1 comme appât ont permis de récupérer la protéine 14-3-3ε (partenaire d'interaction de SRSF10) et la protéine hnRNP A1 (partenaire d'interaction de Sam68). Alors que SRSF10, 14-3-3ε, hnRNP A1/A2 et Sam68 ne participent que faiblement à la régulation normale de l'épissage alternatif de Bcl-x, celles-ci deviennent des joueurs clés de la levée de la répression du site xS suite à l'induction de dommages à l'ADN ou à la répression de PKC. Le traitement à l'oxaliplatine ou à la staurosporine entraîne un remodelage dynamique des interactions protéiques entre les RBPs repêchées et de leur liaison à l'ARN pré-messager de Bcl-x. En étudiant la régulation de d'autres pré-ARNm, nous avons constaté que plusieurs composantes de ce réseau de régulation constituent des effecteurs communs permettant une coordination de la régulation de l'épissage alternatif de transcrits impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN en réponse à l'induction de stress.

La deuxième partie de cette thèse traite de l'instabilité génomique et de son impact permanent sur les profils d'épissage alternatif. Les stress génotoxiques introduisent une instabilité génomique et nous postulons que ceux-ci peuvent provoquer des mutations pouvant affecter l'épissage de manière permanente. Une diminution transitoire dans l'abondance d'un facteur d'épissage peut entraîner l'apparition de dommages à l'ADN via la formation d'une structure ARN-ADN appelée R-loop. En étudiant la régulation de l'épissage alternatif de 192 événements dans les cellules HCT116, nous avons premièrement observé que les profils d'épissage évoluent dans les cellules en culture. Cette altération de base a pu être stimulée par un traitement impliquant des déplétions transitoires de RNPS1, et ce, seulement pour les événements d'épissage régulés normalement par RNPS1. Cette altération découlerait de l'apparition de mutations chez les unités dont l'épissage est régulé par RNPS1, tel qu'observé pour ADARB1, une conclusion soutenue par des transfections croisées et le séquençage direct d'unités.

Mots clés : Épissage alternatif, DDR, PKC, Bcl-x, régulation combinatoire, RNPS1, instabilité génomique

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction.....	1
1. L'épissage.....	1
1.1. Réaction d'épissage.....	4
1.1.1 Spliceosome majeur et introns U2.....	6
1.1.2. Spliceosome mineur et introns U12.....	8
1.2. Modes d'épissage alternatif.....	8
2. Régulation de l'épissage alternatif.....	10
2.1. Force des sites d'épissage.....	11
2.2. Longueur exon/intron.....	12
2.3. Régions régulatrices et facteurs d'épissage.....	13
2.3.1. Structure secondaire de l'ARN.....	14
2.3.2. Facteurs d'épissage.....	16
2.3.2.1. Protéines SR.....	19
2.3.2.2. Protéines hnRNPs.....	21
2.3.2.3. Mécanismes de régulation de l'épissage alternatif.....	22
2.3.2.3.1. Recrutement direct de la machinerie du spliceosome.....	22
2.3.2.3.2. Altération de l'activité de régions régulatrices et facteurs d'épissage.....	24
2.3.2.3.3. Contrôle de la transition entre les différents intermédiaires du spliceosome.....	24
2.3.2.3.4. Définition d'exon et d'intron.....	25
2.3.2.3.5. Mécanisme de looping-out.....	26
2.3.2.3.6. Multimérisation de facteurs d'épissage.....	27
2.3.2.3.7. Altération de la structure secondaire de l'ARN.....	28
2.3.2.4. Modifications post-traductionnelles.....	28
2.3.2.5. Signalisation cellulaire.....	30

2.3.2.6. Patron d'expression tissulaire.....	33
2.4. Régulation cotranscriptionnelle.....	36
2.5. Influence de la chromatine.....	41
3. Gardien de la stabilité génomique.....	43
3.1. R-loops.....	47
3.1.1. Rôles bénéfiques des R-loops.....	49
3.1.2. Conséquences négatives de la formation de R-loops.....	52
3.1.3. Prévention de la formation des R-loops.....	55
3.2. Évolution.....	57
3.3. Différence interindividuelle de la régulation de l'épissage alternatif.....	62
3.4. Maladies et épissage alternatif.....	64
4. L'apoptose et l'épissage alternatif.....	65
4.1. Voie extrinsèque.....	68
4.2. Voie intrinsèque.....	68
4.3. Implication de l'épissage alternatif.....	71
5. Bcl-x.....	74
5.1. Isoformes majeures de Bcl-x.....	75
5.2 Isoformes mineures de Bcl-x.....	77
5.3 Régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x.....	80
Problématique.....	92
Chapitre I-Article : hnRNP A1/A2 and Sam68 collaborate with SRSF10 to control the alternative splicing response to DNA damage.....	95
Chapitre II-hnRNP A1/A2 et Sam68 sont essentiels à un changement de l'épissage de Bcl-x suscité par l'inhibition de la voie de signalisation de PKC.....	150
Chapitre III-Altération maintenues de l'épissage alternatif par la déplétion transitoire de RNPS1.....	159
Discussion.....	196
Remerciements.....	221
Annexes.....	222
Liste des références.....	227

LISTE DES FIGURES

Figure 1: L'épissage alternatif et la diversité protéique.....	2
Figure 2: Réactions d'épissage.....	5
Figure 3: Types d'événements d'épissage alternatif.....	10
Figure 4: Conservation du site d'épissage donneur.....	12
Figure 5: Mécanismes de régulation de l'épissage alternatif par une structure secondaire de l'ARN.....	15
Figure 6: Mécanismes de régulation de l'épissage alternatif par les facteurs protéiques trans.....	23
Figure 7: Modèle cinétique de la régulation cotranscriptionnelle de l'épissage alternatif.....	38
Figure 8: Instabilité génomique par la formation de R-loop.....	46
Figure 9: Rôles bénéfiques des R-loops.....	50
Figure 10: R-loops comme source d'instabilité génomique.....	54
Figure 11: Exonisation des éléments Alu.....	60
Figure 12: Apoptose cellulaire et ses deux voies majeures.....	67
Figure 13: Modèles de la relation fonctionnelle entre les membres de la famille Bcl-2.....	70
Figure 14: Régulation de l'apoptose cellulaire par l'épissage alternatif.....	72
Figure 15: L'épissage alternatif de Bcl-x.....	76
Figure 16: La régulation complexe de l'épissage alternatif de Bcl-x.....	81
Figure 17: La régulation de l'épissage alternative de Bcl-x est remodelée par les dommages à l'ADN et l'inactivation de la PKC	204
Figure supplémentaire 1: Reproductibilité de l'altération des profils d'épissage	222

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Nomenclature des protéines SR classiques	20
Tableau supplémentaire 1: Liste d'amorces pour réactions RT-PCR.....	223

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique
 AID: *Activation induced (cytidine) deaminase*
 AIF: *Apoptosis-inducing factor*
 Apaf1: *Apoptotic peptidase-activating factor 1*
 ARN: Acide ribonucléique
 ARNi: ARN interférence
 ARNm: ARN messenger
 ASAP: *Apoptosis and splicing associated proteins*
 ASE: Événements d'épissage alternatif
 Bcl-2: *B-cell lymphoma-2*
 BCL2L1: *Bcl-2 like-1*
 BH: Domaine d'homologie à la protéine Bcl-2
 CAD: *Caspase-activated DNase*
 CRCE1: *Ceramide-responsive RNA cis-element 1 et 2*
 CSR: Commutation isotypique
 CTD: Domaine C-terminal de l'ARN polymérase II
 DD: Domaine de mort
 DDR: Voie de réponse aux dommages à l'ADN /*DNA damage response*
 DEAH: Acide aspartique (D) – acide glutamique (E) - alanine (A) – histidine (H)
 DLFT: Dégénérescence lobaire fronto-temporale
 DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*
 DRIP: Immunoprécipitation d'ADN-ARN
 DSCAM: *Down syndrome cell adhesion molecule*
 EDI: *Extra domain I*
 EJC: Complexe de jonction d'exons/*exon junction complex*
 ESE: *Exonic splicing enhancer*
 ESS: *Exonic splicing silencer*
 FADD: *FAS-associated death domain*

FBS: Sérum fœtal bovin

FN: Fibronectine

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

HDAC1: Déacétylase d'histone 1

HIT-CLIP: Séquençage à haut débit d'ARN isolé via immunoprécipitation par pontage UV/
high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation

hnRNP: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

IAP: Inhibiteur d'apoptose/*inhibitor of apoptosis protein*

IL: Interleukine

IRES: *Internal ribosome entry site*

ISE: *Intronic splicing enhancer*

ISS: *Intronic splicing silencer*

KH: Homologie à hnRNP K/*hnRNP K homology*

KHDRBS1: *KH domain-containing RNA-binding signal transduction associated protein 1*

MAC: *Mitochondrial apoptosis-induced channel*

MOMP: Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie

NMD: Dégradation des ARN messager non-sens/*nonsense mediated decay*

Nt: Nucléotide

PARP: Polymérase poly-ADP ribose

PBS: Tampon phosphate salin/*phosphate buffered saline*

PCD: Mort cellulaire programmée

pol: Polymérase

PP1 et PP2A: Phosphatase de protéines 1 et 2A

PPT: Région riche en pyrimidines/*polypyrimidine tract*

Pré-ARNm: ARN messager précurseur

PTB: *Polypyrimidine tract binding*

PTC: Codon prématuré de terminaison/*premature terminaison codon*

RBD: Domaine de liaison à l'ARN/*RNA-binding domain*

RBM: *RNA binding motif protein*

RBP: Protéine liant l'ARN/*RNA-binding protein*

RFLS: *R-loop forming sequence*

RNase H1: Ribonucléase H1
 RNPS1: *RNA-binding protein with serine-rich domain 1*
 RRM: Motif de reconnaissance de l'ARN/*RNA recognition motif*
 RS ou SR: Arginines-sérines
 RT-PCR: *Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*
 Sam68: *Src Associated in Mitosis of 68 kDa*
 SELEX: *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*
 SHM: Hypermutation somatique
 SINE : *Short interspersed element*
 SLA: Sclérose latérale amyotrophique
 S_N2: Substitutions nucléophiles de type 2
 SNP: Polymorphisme nucléotidique/*single nucleotide polymorphism*
 snRNA: Petits ARN nucléaires/*small nuclear RNA*
 snRNP: Petite ribonucléoprotéine nucléaire/*small nuclear ribonucleoprotein*
 SRSF: Facteur d'épissage SR/*SR splicing factor*
 STAR: *Signal transduction and activation of RNA*
 TAM: *Transcription-associated mutagenesis*
 TAP: *Tandem-affinity purification*
 TAR: *Transcription-associated recombinaison*
 TCERG1: *Transcription elongation regulator 1*
 TDP-43: *TAR-DNA binding Protein 43*
 TNFR: *Tumor necrosis factor receptor*
 TRADD: *TNFR-associated death domain*
 U2AF: Facteur auxiliaire de U2/*U2 auxiliary factor*
 UTR: Région non-traduite/*untranslated region*
 VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

1. L'épissage

L'observation, il y a de cela 40 ans, par microscopie électronique qu'un ARN messager (ARNm) mature (l'adénovirus humain de type 2) ne s'hybride pas en plusieurs endroits de façon complémentaire avec son précurseur d'ADN a pavé la voie à la découverte et l'étude d'un des multiples processus de maturation post-transcriptionnelle des pré-ARN messagers (pré-ARNm), à savoir l'épissage (Berget et al. 1977; Chow et al. 1977). La découverte simultanée que le locus de la chaîne lourde μ de l'immunoglobuline peut produire deux ARNm différant au niveau de leur portion 3' (μ_M et μ_S) est venue ébranler le dogme central de la biologie moléculaire et sonna le début de l'étude du processus d'épissage alternatif (Alt et al. 1980; Early et al. 1980). Contrairement à l'épissage constitutif où l'ensemble des introns sont excisés et tous les exons sont gardés pour ne former qu'un seul ARNm mature duquel découlera une seule protéine, l'épissage alternatif consiste en une situation où un exon, un intron ou une partie de ceux-ci peut être occasionnellement inclus ou non dans l'ARNm mature, ouvrant la possibilité de la production éventuelle d'au moins deux isoformes protéiques différentes dérivées d'un même pré-ARNm (Black 2003) (Fig. 1A).

Donc, par ce fait, un rôle majeur associé à l'épissage alternatif est d'entraîner une augmentation de la diversité protéique à partir d'un bassin restreint de pré-ARNm. Cette diversification entraîne par conséquent une augmentation significative de la complexité des cellules et des organismes qui en sont composés puisque les protéines ainsi produites n'assument pas nécessairement les mêmes fonctions ou propriétés (Nilsen and Graveley 2010). En effet, l'ajout ou le retrait de domaines protéiques par l'inclusion/exclusion de régions intragéniques ou par un changement du cadre de lecture peut affecter grandement la fonctionnalité d'une protéine en altérant son activité, sa localisation et même sa stabilité. Le nombre relativement invariable de gènes au sein des différents eucaryotes multicellulaires dispersés à la grandeur de l'arbre phylogénétique souligne l'importance du processus d'épissage alternatif dans la diversification protéique (Koralewski and Krutovsky 2011).

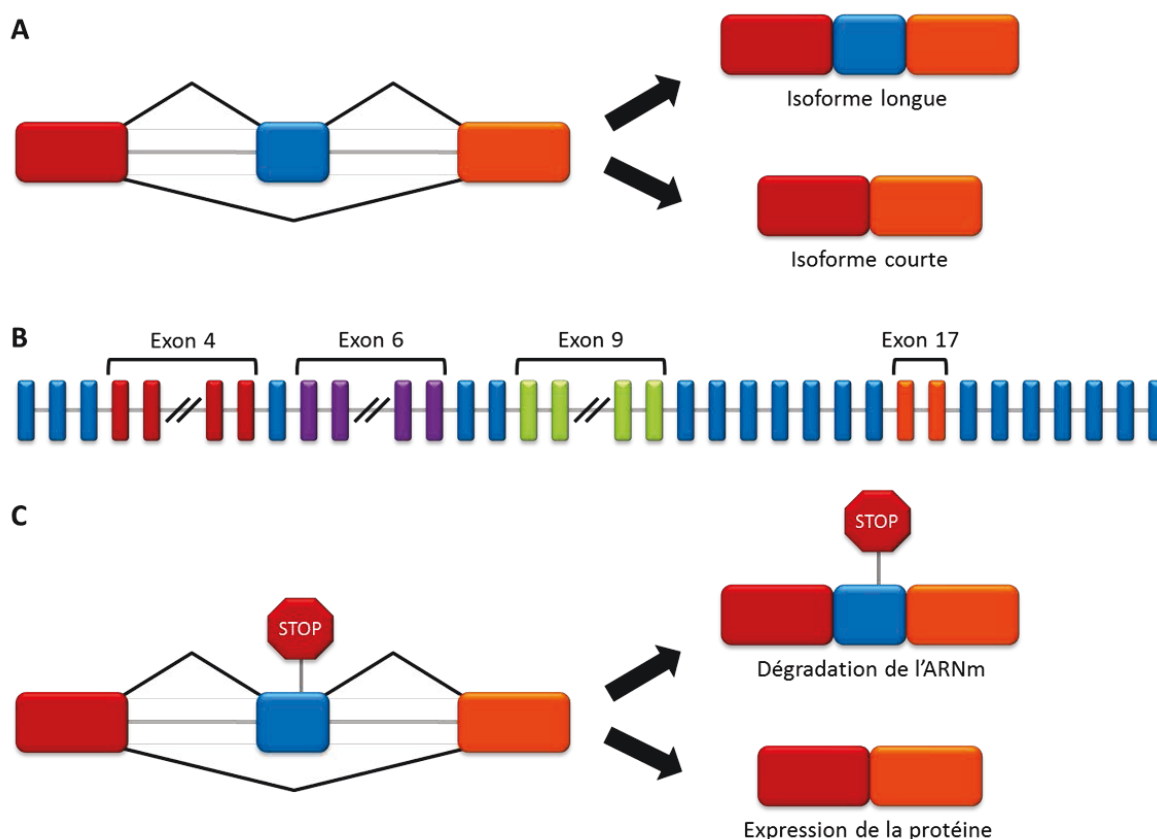


Figure 1: L'épissage alternatif et la diversité protéique. (A) Exemple simplifié de la diversité générée par l'épissage alternatif des pré-ARNm: il s'agit d'une situation d'exon cassette où l'inclusion ou pas de l'exon central peut entraîner la production de deux isoformes d'ARNm matures (B) Le gène DSCAM de la *Drosophila melanogaster*, exemple extrême de la diversité générée par l'épissage alternatif. 4 situations d'exons mutuellement exclusifs situés au niveau des exons 4 (12 exons), 6 (48 exons), 9 (33 exons) et 17 (2 exons) permet la production de près de 38 000 isoformes différentes (C) Contrôle temporel de l'expression protéique par l'épissage alternatif grâce à l'incorporation d'un PTC (Stop).

L'exemple suprême très souvent cité dans la littérature pour illustrer toute l'amplitude de la diversité protéique qui peut être générée au travers de l'épissage alternatif est le récepteur axonal DSCAM de la *Drosophila melanogaster*. Celui-ci joue un rôle primordial dans l'extension et la migration axonale lors du développement en reconnaissant les signaux de guidage (secrétés ou membranaires) et en induisant une cascade de signalisation par une association avec la protéine adaptatrice Dock, aboutissant à des changements structuraux au niveau du cytosquelette. Ainsi, contenant en lui quatre situations d'exons mutuellement exclusifs (exons 4, 6, 9 et 17) qui présentent 12, 48, 33 et 2 exons alternatifs pour les domaines immunoglobuline 2, 3 et 7 et le domaine transmembranaire respectivement, ce

seul pré-ARNm est en mesure de générer jusqu'à 38 016 isoformes possibles aux propriétés différentes (Schmucker et al. 2000) (Fig. 1B).

Un deuxième rôle majeur de l'épissage est qu'il permet le contrôle de l'expression d'une protéine au travers du contrôle de la dégradation de son ARNm (Fig. 1C). La ligation de deux exons lors de la réaction d'épissage entraîne le dépôt par le spliceosome du complexe de jonction d'exons (EJC) 20 à 24 nt en amont de la jonction exon-exon (Le Hir et al. 2000). Environ le tiers des transcrits d'ARN mature produits dans la cellule humaine contiennent des exons ayant un codon prématuré de terminaison (PTC) (Lewis et al. 2003). La présence d'un PTC à plus de 50-55 nucléotides (nt) en amont d'un complexe EJC entraîne sa reconnaissance lors de la première ronde de traduction, et la dégradation subséquente du transcrit par la machinerie du NMD (*nonsense mediated decay*) (Maquat 2004). La traduction de tels transcrits pourrait entraîner la production de protéines tronquées aux conséquences néfastes pour l'homéostasie de la cellule.

L'épissage alternatif constitue en quelque sorte un terreau propice à l'expérimentation et à l'évolution. L'isoforme contenant un exon nouvellement créé est normalement produite de façon minoritaire vis-à-vis l'originelle. Cette situation, possiblement moins soumise aux pressions sélectives, pourrait permettre d'acquérir de nouvelles propriétés bénéfiques tout en préservant la fonction d'origine. Si tel est le cas, la production de cette isoforme se verra être graduellement favorisée. L'épissage alternatif permet donc de créer du nouveau matériel à partir de l'ancien, tout en conservant celui-ci. En plus, outre l'épissage alternatif, l'évolution de la diversité protéique découle aussi de la duplication génétique, fréquente chez les plantes à fleurs (Cui et al. 2006). La préférence pour l'utilisation de l'épissage alternatif au détriment de la duplication génétique chez les organismes les plus complexes pourrait s'expliquer par le fait que l'accroissement en nombre de gènes causé par la duplication s'accompagne d'une explosion de la taille du réseau de régulation qui devient à partir d'un certain seuil un poids insurmontable. Cette charge est assouplie entre autres par l'utilisation de l'épissage alternatif qui évite l'augmentation excessive de gènes codant pour des protéines tout en diversifiant le protéome (Koonin and Wolf 2010).

Initialement perçu comme une excentricité, les études des dernières années ont démontré la quasi-universalité de l'épissage alternatif des pré-ARNm multiexoniques des métazoaires. Chez l'humain, l'utilisation de techniques de séquençage à haut débit du transcriptome dans divers tissus a permis d'estimer que l'épissage de 92-97 % des pré-ARNm issus de gènes multiexoniques (94% du génome) produits au moins deux transcrits matures différents dont une isoforme mineure en quantité significative (au moins 15% du ratio total) dans la majorité des cas (Pan et al. 2008; Wang et al. 2008). En moyenne, chez l'humain, l'épissage alternatif d'un pré-ARNm multiexonique engendre la production de sept à douze ARNm matures, selon les lignées cellulaires étudiées (Pan et al. 2008; Djebali et al. 2012).

1.1. Réaction d'épissage

L'excision ou épissage de régions du pré-ARNm est le produit de deux réactions successives de transestérification catalysées par un complexe macromoléculaire, le spliceosome. Au cours des différentes étapes successives de reconnaissance initiale des régions cibles sur le pré-ARNm et de la catalyse des deux substitutions nucléophiles de type 2 (S_N2) subséquentes, le spliceosome fera face à de multiples remodelages dynamiques intensifs qui impliqueront un total d'un peu plus de 170 différentes protéines, ainsi que cinq petits ARN nucléaires (snRNA) (Wahl et al. 2009). La présence de l'ensemble de ces 170 protéines n'est pas indispensable à l'épissage de chaque intron et la redondance fonctionnelle de plusieurs d'entre elles a permis une flexibilité adaptative au spliceosome face à l'environnement divers de ces cibles au sein des pré-ARNm

Les deux réactions S_N2 impliquent différents groupes fonctionnels situés au sein de trois régions précises du pré-ARNm; les sites d'épissage donneurs (5') et accepteurs (3') définissant les limites de l'intron, ainsi que le point de branchement avec son adénosine conservée situé à l'intérieur de l'intron même et normalement localisé environ 50 à 15 nt en amont du site d'épissage 3' (Will and Luhrmann 2011; Matera and Wang 2014). Lors de la première réaction S_N2 , le groupement hydroxyle (2'-OH) de l'adénosine située au point de branchement attaque le premier nucléotide intronique situé au site d'épissage 5'. Cela entraîne la formation d'un nouveau lien phosphodiester entre ces deux nucléotides et par

conséquent la rupture de l'ancien lien situé à la jonction exon-intron, résultant en la création d'un intermédiaire lariat comprenant l'intron et l'exon 3'. La deuxième réaction de transestérification a lieu lorsque le groupement 2'-OH réactif libre de l'exon 5' attaque à

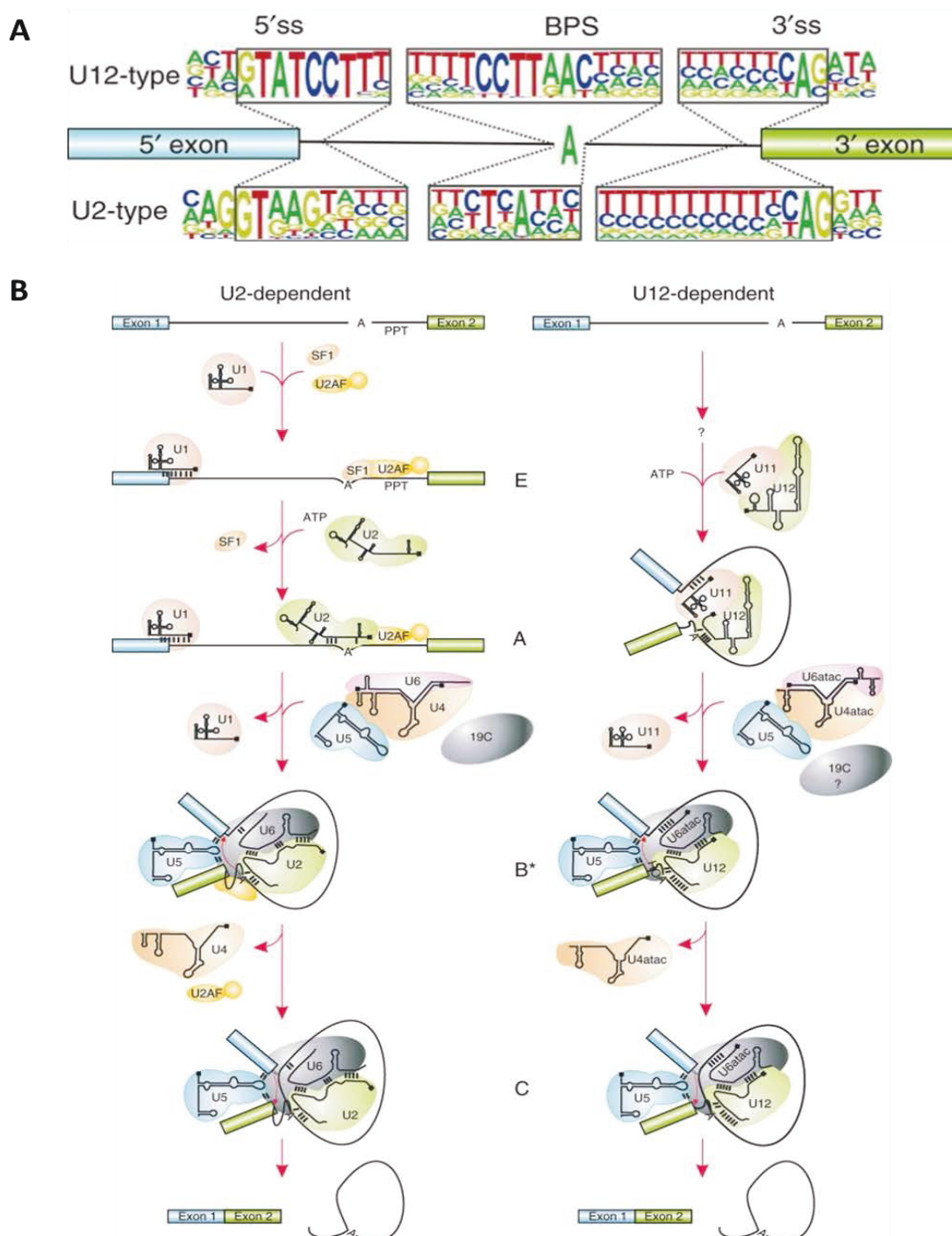


Figure 2: Réactions d'épissage. (A) Séquences consensus des introns humains U12 (en haut) et U2 (en bas). La hauteur des lettres à chaque position correspond à la fréquence relative des nucléotides individuels à cette position (B) Réaction d'épissage catalysée par le spliceosome majeur (à gauche) ou mineur (à droite). Représentation simplifiée de

l'assemblage des différents intermédiaires d'un spliceosome fonctionnel (Turunen et al. 2013).

son tour le dernier nucléotide intronique situé au site d'épissage 3', entraînant par la formation d'un nouveau lien phosphodiester le rattachement des exons et par la rupture de l'ancien l'expulsion de l'intron sous forme de lariat (Wahl et al. 2009; Will and Luhrmann 2011; Matera and Wang 2014). Au sein des cellules de métazoaires, deux types de spliceosome existent; les spliceosomes majeur et mineur ou dit U2 et U12-dépendant respectivement selon l'identité de l'intron dont il catalyse l'excision.

1.1.1. Spliceosome majeur et introns U2

La quasi-totalité des introns humains est reconnue par le spliceosome majeur ou U2-dépendant (Fig. 2B) (Sheth et al. 2006). En plus des trois régions mentionnées précédemment, ces introns possèdent une région de 11-20 nt riche en pyrimidines (PPT) prise entre le site d'épissage 3' et le point de branchement qui est primordiale pour l'assemblage d'un spliceosome fonctionnel (fig. 2A). Les sites d'épissage des introns U2 étant hautement dégénérés chez les métazoaires au contraire de la levure (Sheth et al. 2006) et les exons étant relativement petits, la bonne reconnaissance et assemblage du spliceosome nécessite l'appui activateur ou inhibiteur de régions en cis auxquelles se lient des facteurs trans tels les protéines SR (sérines-arginines) quasi absentes chez la levure (Kress et al. 2008).

U1, U2, U4, U5 et U6 snRNAs (sous la forme de snRNPs ou *small nuclear ribonucleoprotein*) seront employés à diverses étapes par le spliceosome majeur (Fig. 2B). L'aboutissement de l'excision de l'intron verra le spliceosome se métamorphoser en 5 intermédiaires fonctionnels distincts, soit les complexes E, A, B, B activé et C (Wahl et al. 2009; Will and Luhrmann 2011; Matera and Wang 2014). Lors de la formation du complexe E ou d'engagement, U1 snRNP lie de façon indépendante de l'ATP le site d'épissage 5' avec l'aide des protéines associées U1-C, U1A et U1-70K, alors que la protéine SF1/mBBP et les sous-unités 65 et 35 kDa du facteur U2AF s'hybrident respectivement au point de branchement, au PPT et au site d'épissage 3'. La formation d'un spliceosome actif nécessitant une interaction entre ses différentes composantes

individuelles dispersées aux extrémités d'un intron la plupart du temps de forte taille (supérieure à 200-250 nt) chez les métazoaires, la communication se fera dans un premier temps au travers de l'exon par ce qu'on appelle la définition d'exon (Berget 1995; Fox-Walsh et al. 2005). Ainsi, U1 snRNP, par l'entremise de protéines SR liées à l'exon en amont du site d'épissage 5', va s'associer avec le facteur auxiliaire U2AF et stabiliser son interaction à l'intron précédent. Cette stabilisation va permettre le recrutement de U2 snRNP lors de la formation du complexe A.

U2 snRNP va par la suite, de façon dépendante de l'ATP, déplacer le facteur SF1/mBBP et lier le point de branchement par l'appui des complexes SF3a et SF3b et d'U2AF65, formant ainsi le complexe A. Le duplex d'ARN ainsi formé à cette position va permettre de faire ressortir l'adénosine et son groupement réactif hydroxyle en prévision de la première réaction de transestérification. Au cours du remodelage du spliceosome vers l'obtention du complexe A ou B, une transition encore mal caractérisée vers une communication au travers de l'intron (définition d'intron) nécessitant la rupture des liens intra-exoniques va s'effectuer. Ce nouveau mode de communication va permettre un rapprochement entre le point de branchement et les deux sites d'épissage. Suite à l'arrivée d'U4, U5 et U6 sous la forme de particule tri-snRNPs (complexe B), la liaison d'U6 snRNP au site d'épissage 5' entraîne le déplacement d'U1 snRNP (catalysé par Prp28) et la rupture de l'association entre U4 et U6 snRNAs (catalysée par Brr2). U1 et U4 snRNPs sont ainsi relarguées du complexe spliceosomal. U6 snRNP pourra donc s'associer à U2 snRNP, permettant le rapprochement entre le site d'épissage 5' et le point de branchement en vue de l'attaque nucléophile (complexe B activé).

L'exon 5' libre reste attaché au spliceosome par l'entremise d'une association avec U5 snRNPs qui, par sa liaison simultanée à l'exon 3', permettra la juxtaposition des exons en vue de la deuxième attaque nucléophile. Avant la deuxième transestérification, l'hybridation U6 snRNA/site d'épissage 5' doit être impérativement perdue (complexe C). C'est lors de cette transition vers le complexe C que seront déposés 20-24 nt en amont de la future jonction exon-exon les protéines EJC (Tange et al. 2004). Suite à la deuxième SN2,

catalysée à nouveau par U6 snRNA, l'intron est relargué sous forme de lariat et le complexe spliceosomal est désassemblé (Valadkhan et al. 2007; Valadkhan et al. 2009).

1.1.2. Spliceosome mineur et introns U12

Près de 700 introns humains (moins de 0,5% de l'ensemble des introns) sont reconnus par un deuxième type de spliceosome appelé spliceosome mineur ou U12-dépendant (Sheth et al. 2006). Comparativement aux introns U2, ceux-ci sont nettement plus petits, ne contiennent pas de PPT et possèdent un site d'épissage 5' et de branchement (situé 11 à 16 nt en amont du site d'épissage 3') caractéristiques fort conservés (Fig. 2A) (Burge et al. 1998; Levine and Durbin 2001). Les introns U12 sont épissés cotranscriptionnellement plus lentement que les introns U2, limitant et régulant ainsi l'expression de gènes impliqués pour la plupart dans des fonctions essentielles pour le développement (Burge et al. 1998; Singh and Padgett 2009). Au niveau du spliceosome mineur, les U1, U2, U4 et U6 snRNPs du spliceosome majeur (U5 snRNP est partagé entre les deux spliceosomes) sont remplacés respectivement par U11, U12, U4atac et U6atac snRNPs qui conservent globalement la même structure secondaire fonctionnelle et rôle de leurs homologues (Turunen et al. 2013). La réaction d'épissage elle-même est très similaire à celle catalysée par le spliceosome majeur à quelques exceptions près (Fig. 2B) (Turunen et al. 2013). Contrairement à U1 et U2 snRNPs qui lient indépendamment et à différentes étapes leurs sites respectifs sur le pré-ARNm, U11 et U12 snRNPs (sous la forme d'un di-snRNP) lient simultanément le site d'épissage 5' et le point de branchement. Cela, combiné à l'absence de région riche en pyrimidines et de facteur U2AF élimine l'étape du complexe E.

1.2. Modes d'épissage alternatif

Au sein des cellules eucaryotes, il existe sept différents types d'événements d'épissage alternatif possibles (Fig. 3) (Black 2003). Un pré-ARNm pouvant contenir plusieurs événements d'épissage alternatif, celui-ci peut par conséquent être une combinaison de différents types d'événements. Le plus fréquent, comprenant à lui seul 51% des événements totaux d'épissage chez l'humain, est l'exon cassette où un exon complet peut être exclus ou inclus dans l'ARNm mature (Fig. 3A) (Koralewski and Krutovsky 2011).

Parfois, dans un regroupement d'événements d'exons cassettes successifs, l'incorporation de l'un d'entre eux dans l'ARNm mature entraîne automatiquement l'exclusion des autres. Il s'agit d'une situation d'exons mutuellement exclusifs, le deuxième type d'événement (Fig. 3B). Face à la multitude de sites disponibles pour l'association des différentes composantes du spliceosome dans cette situation complexe, divers mécanismes assurent la sélection d'un exon alternatif unique, que ce soit par encombrement stérique, une combinaison incompatible de sites d'épissage, une compétition au niveau d'une hybridation entre une séquence d'ARN unique ou l'incorporation d'un PTC si plus d'un exon alternatif sélectionné (Southby et al. 1999; Jones et al. 2001; Graveley 2005).

Dans le cas des troisièmes et quatrièmes types d'événements d'épissage alternatif, nous nous trouvons dans une situation de sites d'épissage en compétition (5' ou 3') où une partie d'un exon sera conservée ou pas selon l'utilisation du site proximal ou distal (Fig. 3C et D). La compétition entre sites d'épissage est particulièrement fréquente comparativement aux autres types d'événements dans les tissus hépatiques (Yeo et al. 2004). Les cinquièmes et sixièmes situations ont lieu dans les portions non traduites (UTRs) des pré-ARNm où plusieurs sites de polyadénylation ou promoteurs alternatifs peuvent y être présents et ultimement sélectionnés (Fig. 3E et F). Les études des dernières années ont montré à quel point les processus de transcription et d'épissage sont interreliés et ainsi, selon les différents modèles de régulation cotranscriptionnels (cinétique et de recrutement qui seront abordés en détail plus loin dans cette thèse) comment l'utilisation de différents promoteurs peut affecter la régulation d'événements d'épissage alternatif situés en aval. Finalement, un intron peut être retenu ou pas (situation de rétention d'intron) dans l'ARNm mature, étant possiblement par le fait traduit lors de la synthèse de la protéine (Fig. 3F). Ce dernier type d'événement d'épissage est particulier dans le sens que, contrairement aux précédents, il ne s'agit pas de compétition au niveau de l'utilisation de sites d'épissage.

Le mode ou type d'événement d'épissage alternatif le plus fréquent varie d'une espèce et d'un tissu à l'autre (Yeo et al. 2004; Koralewski and Krutovsky 2011). Alors que chez la plante *Arabidopsis thaliana* et le nématode *Caenorhabditis elegans* la compétition entre sites d'épissage 3' est le mode d'épissage alternatif le plus populaire, il s'agit plutôt de

l'exon cassette chez l'humain, la souris et la drosophile, ce qui est possiblement un reflet de l'importance du <<shuffling>> d'exons dans l'apparition des protéines modulaires chez les eucaryotes supérieurs. La rétention d'intron est le principal mode d'épissage alternatif pour les quelques événements présents chez les eucaryotes unicellulaires (Koralewski and Krutovsky 2011).

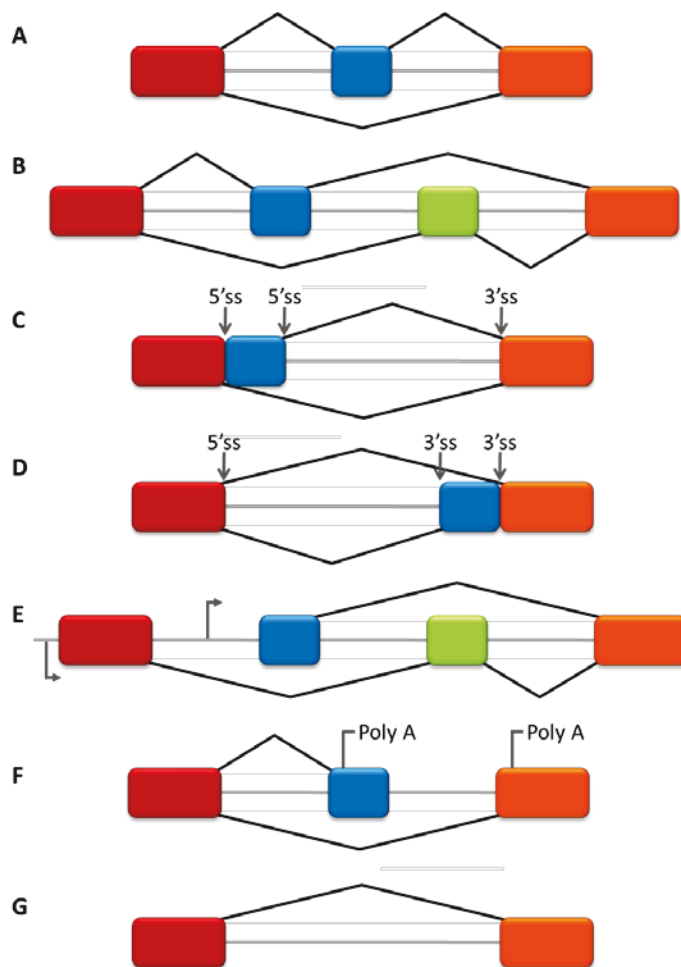


Figure 3: Types d'événements d'épissage alternatif. (A) Exon cassette (B) Exons mutuellement exclusifs (C) Sites d'épissage 5' alternatifs (D) Sites d'épissage 3' alternatifs (E) Promoteurs alternatifs (F) Sites de polyadénylation alternatifs (G) Rétention d'intron.

2. Régulation de l'épissage alternatif

Un gène humain moyen a une longueur de 27 000 nt et comprend 8,8 exons chacun d'une longueur moyenne de 145-175 nt (Lander et al. 2001; Koralewski and Krutovsky 2011). Ainsi, les exons sont tels des îlots dans un océan d'introns. Comment les sites d'épissage dans cette vaste immensité sont reconnus et distingués en autres des leurres tels que les pseudo-sites par la machinerie du spliceosome découle d'une série de facteurs qui lorsque

combinés détermineront la fréquence d'utilisation de ces sites. Cette régulation combinatoire, en plus de l'interconnectivité à d'autres processus régissant la vie d'un ARNm, a grandement complexifié l'étude de la régulation de l'épissage alternatif et constitue le nouveau créneau à explorer au cours des prochaines années dans ce domaine qui a longtemps été étudié en silo.

Dans la majorité des cas, la régulation de la production des différentes isoformes d'ARNm s'effectue lors des étapes initiales de l'assemblage du spliceosome, telle la formation des complexes E et A (Black 2003). Cependant, la réversibilité de la catalyse de l'excision à toutes ses étapes ouvre la porte à une régulation plus tardive du processus d'épissage alternatif (Tseng and Cheng 2008; Hoskins et al. 2011). Nous traiterons individuellement dans cette section de l'ensemble des facteurs influençant la sélection d'un site d'épissage au détriment d'un autre, bien qu'il faille garder en tête l'influence mutuelle de ces facteurs sur leur activité de régulation.

2.1. Force des sites d'épissage

Au centre même de l'existence de cette possibilité d'isoformes multiples, le premier facteur est le niveau de dégénérescence des sites d'épissage par rapport à leur séquence consensus. Tel qu'exposé précédemment, l'assemblage du spliceosome dépend fortement d'un appariement entre des régions clés présentes au sein du pré-ARNm cible et les petits ARN non codants contenus dans les particules snRNPs, un appariement qui dépend du niveau de complémentarité. Le niveau de dégénérescence, un continuum allant de sites ayant une homologie parfaite (exon constitutif) à des sites de plus en plus dégénérés (exon alternatif), mène à l'attribution d'une étiquette de force aux sites d'épissage. En comparant la conservation du site d'épissage 5' (Fig. 4) au travers des différents eucaryotes, on constate la relation de causalité entre la force des sites d'épissage et la fréquence des événements alternatifs au sein du génome de l'organisme, passant de sites forts dans des organismes unicellulaires n'ayant peu ou pas d'événements d'épissage alternatif à des sites fortement dégénérés où l'épissage alternatif est omniprésent (Wood et al. 2002; Barrass and Beggs 2003; Pan et al. 2008; Wang et al. 2008). Cette transition vers la dégénérescence des sites d'épissage et l'émergence de l'épissage alternatif découle d'un relâchement de la pression

sélective au niveau de ces régions essentielles et de la spécialisation d'une nouvelle classe de protéines dans la régulation du processus d'épissage. Laquelle de ces conditions a émergé en premier et permis l'apparition de la suivante reste encore nébuleux (Ast 2004). Le recrutement d'un domaine RS (arginines-sérines) chimérique à proximité de site d'épissage 5' et point de branchement mutés au sein du pré-ARNm de l'actine dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un organisme qui ne contient pas de protéines SR, a permis une reconnaissance accrue de ces sites par la machinerie du spliceosome. Ceci a eu comme effet de mener à une plus grande tolérance de la part du spliceosome au niveau de la variabilité nucléotidique (Izquierdo and Valcarcel 2006; Shen and Green 2006).

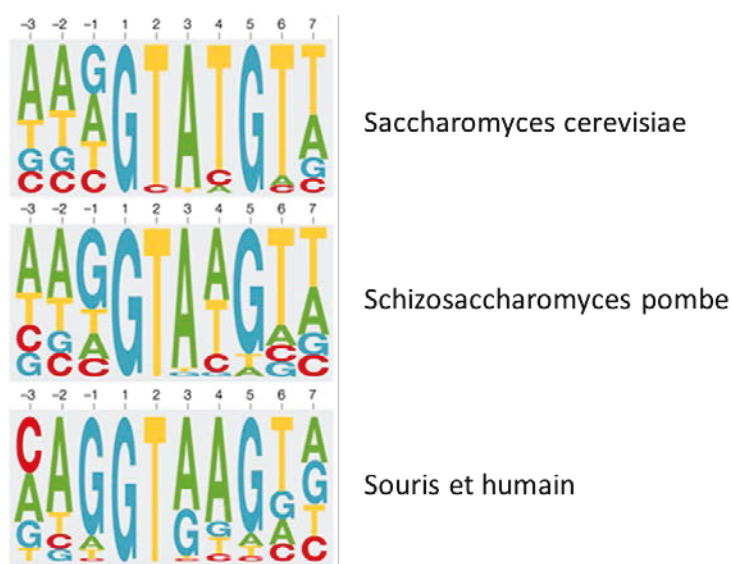


Figure 4: Conservation du site d'épissage donneur. Comparaison de la conservation des séquences au niveau du site d'épissage 5' (donneur) entre 2 mammifères (souris et humain) et 2 levures (*S. cerevisiae* et *S. pombe*) (Ast, 2004).

2.2. Longueur exon/intron

Alors que le nombre moyen d'exons par gène s'accroît avec la progression dans l'arbre phylogénétique, la longueur moyenne des exons en contrepartie diminue, alors que celle des introns, initialement courte s'est graduellement accrue (Barrass and Beggs 2003; Koralewski and Krutovsky 2011). Ainsi, la longueur même des régions introniques ou exoniques, ne serait-ce que par l'accroissement possible du nombre de régions régulatrices en cis et de pseudo-sites et l'impact sur la communication entre les composantes dispersées du spliceosome, influence l'inclusion d'un exon dans le produit mature final. Un exon possédant des sites d'épissage faibles et entouré de longs introns est majoritairement exclu

de l'ARNm, exclusion qui est renversée par le raccourcissement des régions introniques (Fox-Walsh et al. 2005). À l'instar des introns, l'allongement des exons au-delà de 300 nt favorise l'exclusion de ceux-ci (Berget 1995). De même, par un possible risque d'encombrement stérique entre les composantes du spliceosome, une taille minimale pour l'exon est préférée. Ainsi, une taille inférieure à 50 nt favorise l'exclusion et l'activation de sites d'épissage cryptiques avoisinants (Berget 1995).

2.3. Régions régulatrices et facteurs d'épissage

L'émergence des sites d'épissage dégénérés s'est accompagnée de la formation et de la conservation de séquences régulatrices en cis (Lev-Maor et al. 2007). Les régions introniques entourant les exons alternatifs sont plus fortement conservées que celles ceinturant les exons épissés constitutivement (Sorek et al. 2002). Cette conservation des régions régulatrices en cis sous-entend une participation critique à la reconnaissance par la machinerie du spliceosome de ces sites d'épissage faibles. En effet, la présence de mutations inactivatrices dans ces régions (ou au niveau du point de branchement) n'affecte la régulation de l'épissage alternatif que dans un contexte de site d'épissage faible (caractère alternatif) contrairement à celui d'un site fort (caractère constitutif) (Lev-Maor et al. 2007). L'établissement d'une activité régulatrice auprès de ces régions dans la régulation de l'épissage alternatif a possiblement été accompagné de l'acquisition d'une fonction régulatrice auprès de certaines protéines liant l'ARN et d'une expansion de ces nouvelles familles de facteurs d'épissage. L'allongement des introns chez les eucaryotes supérieurs accroît la possibilité d'y trouver des pseudo-sites non fonctionnels ceinturant des pseudo-exons. La machinerie du spliceosome doit donc être en mesure de discerner ces leurres des sites véritables et pour se faire, les éléments régulateurs en cis inhibiteurs jouent un rôle déterminant dans cette sélection (Sun and Chasin 2000).

Basé sur leur position au sein du pré-ARNm et leur impact sur la régulation de l'utilisation du site d'épissage à proximité, les régions régulatrices en cis sont divisées en quatre catégories distinctes; les ISE et ESE activatrices (*intronic splicing enhancer* et *exonic splicing enhancer* respectivement) et les ISS et ESS inhibitrices (*intronic splicing silencer* et *exonic splicing silencer* respectivement) (Smith and Valcarcel 2000; Black 2003). Bien

qu'antérieurement les études se soient concentrées aux régions entourant les environs immédiats des sites d'épissage, des études récentes ont démontré que des régions introniques distales (distance supérieure à 500 nt) ont aussi le potentiel d'influencer la sélection des sites d'épissage (Zhang et al. 2005; Lovci et al. 2013). Ces régions régulatrices sont principalement constituées de structures secondaires de l'ARN ou de courtes séquences (4 à 10 nt) servant de sites de liaison pour des facteurs protéiques trans ayant un rôle à jouer dans la reconnaissance des sites d'épissage. L'activité de ces régions régulatrices en cis dépendra de la position relative de celles-ci par rapport au site d'épissage qu'elles régulent, du contexte environnant immédiat et du contexte cellulaire (Wang and Burge 2008).

2.3.1. Structure secondaire de l'ARN

Le repliement même du pré-ARNm peut avoir une influence déterminante sur l'inclusion d'un exon alternatif. Une première démonstration de l'influence d'une structure secondaire dans la régulation de l'épissage alternatif fut la séquestration par une tige-boucle intronique d'un exon cassette complet dans sa portion bouclée, résultant en son exclusion (Solnick and Lee 1987) (Fig. 5A). La formation de structure secondaire de l'ARN tels un duplex ou une tige-boucle peut masquer ou empêcher l'accessibilité par séquestration à un site d'épissage (ex : site d'épissage 5' de l'exon 10 de MAPT ou de l'exon 7B d'hnRNP A1), un pseudo-site (ex : au sein de l'intron 20 d'ATM) ou une séquence régulatrice en cis (Blanchette and Chabot 1997; Donahue et al. 2006; Buratti et al. 2007) (Fig. 5B). En effet, la reconnaissance des motifs de liaison par les facteurs d'épissage nécessite dans la majorité des cas leur maintien dans une conformation simple brin afin d'en assurer l'accessibilité (Hiller et al. 2007). Dans ce contexte, une structure secondaire de l'ARN peut aussi favoriser l'accessibilité à un site d'épissage ou à une région régulatrice en maintenant celle-ci dans une conformation simple brin, comme c'est le cas pour le point de branchement de l'intron 1 d'ADH de la drosophile où une tige-boucle maintient celui-ci de façon non appariée (Chen and Stephan 2003) (Fig. 5C).

Une structure secondaire peut aussi servir de point d'ancrage pour la liaison de facteurs protéiques impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif tel que pour SRSF6 au

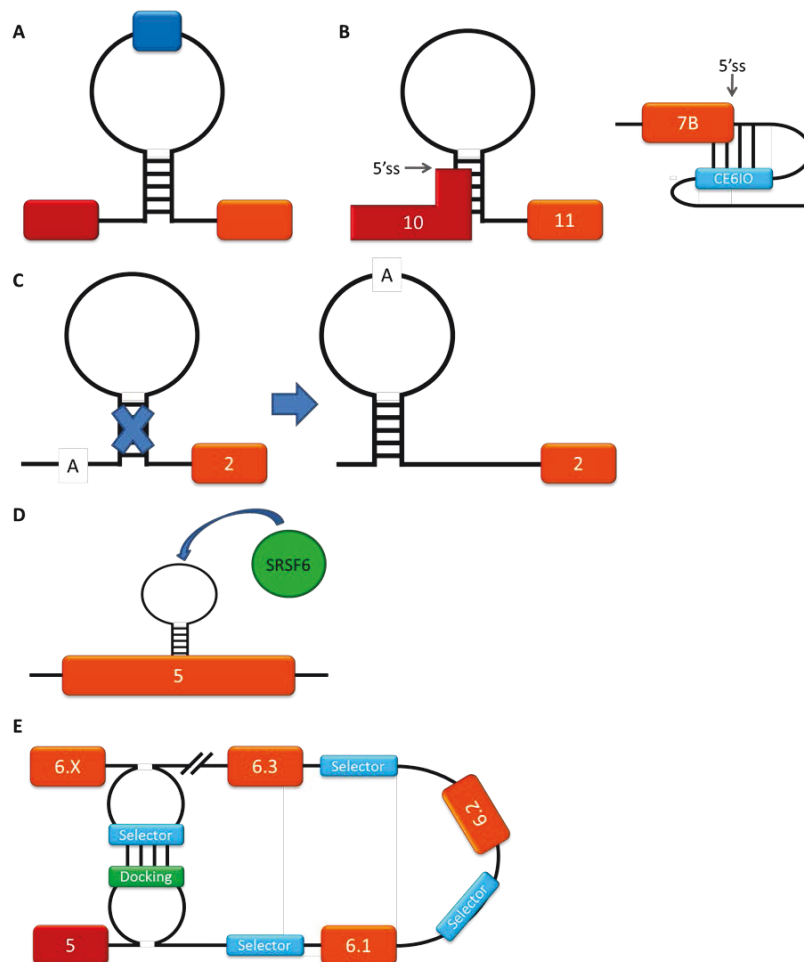


Figure 5: Mécanismes de régulation de l'épissage alternatif par une structure secondaire de l'ARN. (A) Séquestration d'exon ou rapprochement d'éléments cis par la formation de boucle (loop) (B) Blocage de l'accessibilité à un site d'épissage ou une séquence régulatrice en cis (C) Maintien de l'accessibilité par une conformation simple-brin (D) Motif de liaison pour facteur d'épissage (E) Sélection par un appariement unique de séquences résultant en la formation d'une boucle.

niveau du motif GAR dans l'exon 5 de la troponine T cardiaque aviaire (Nagel et al. 1998) (Fig. 5D). La formation d'une boucle intra ou inter-intronique peut faciliter l'assemblage du spliceosome en rapprochant et juxtaposant les sites d'épissage, ainsi que les régions essentielles à la catalyse de la réaction d'épissage telle que le point de branchement (ex : l'intron de rp51B de la levure *S. cerevisiae*), ou des sites de liaison pour facteur protéique trans, (ex :RBFOX au sein de KIF21A et d'ENAH) (Charpentier and Rosbash 1996; Lovci et al. 2013) (Fig. 5A). Cette juxtaposition par boucle est un moyen fréquent employé chez la levure pour faciliter l'assemblage du spliceosome au niveau des introns (Newman 1987).

L'épissage de DSCAM chez la drosophile emploie une variante originale de ce mécanisme par lequel une structure secondaire de l'ARN peut influencer la sélection d'un exon alternatif. Au niveau de l'exon 6 se trouve un regroupement de 48 exons alternatifs mutuellement exclusifs. Dans l'intron situé entre l'exon constitutif 5 et le premier exon alternatif 6 se trouve une séquence unique de 66 nt hautement conservée appelée *docking* (ou réceptrice). En amont de chacun des 48 exons alternatifs se trouve une seconde séquence hautement conservée, appelée *selector* (ou sélectrice) dont 28 nt centraux ont une complémentarité parfaite par la séquence *docking*. Ainsi une hybridation unique et sélective pourra avoir lieu avec une seule des séquences en compétition qui, par la formation d'une boucle, juxtapose un seul des exons alternatifs avec l'exon constitutif 5 (Graveley 2005) (Fig. 5E). Cette hybridation/boucle inter-intronique activatrice va permettre aussi le départ sélectif du répresseur HRP36 auparavant lié à l'exon alternatif sélectionné et l'arrivée de protéines SR activatrices (Olson et al. 2007). Ce mécanisme de sélection d'un exon alternatif par une compétition de structures d'ARN fut par la suite découvert au niveau des exons 4 et 9 de DSCAM, ainsi qu'au niveau du pré-ARNm de la chaîne lourde de myosine (MHC) chez la drosophile et de l'exon 5 de 14-3-3 ξ chez l'*Apis mellifera* (abeille) (Yang et al. 2011).

2.2.3.2. Facteurs d'épissage

L'existence de protéines ayant un rôle à jouer dans la régulation du profil d'événements d'épissage alternatif fut d'abord révélée chez la drosophile (Boggs et al. 1987; Zachar et al. 1987; Amrein et al. 1988; Bell et al. 1988). Cette découverte a permis d'envisager l'existence de ce système de régulation au sein des cellules humaines, situation confirmée par l'action d'un membre de la famille élargie des protéines SR (Ge and Manley 1990; Krainer et al. 1990). L'action régulatrice de ces facteurs d'épissage est principalement véhiculée au travers de leur liaison à des séquences de haute affinité contenues au sein des pré-ARNm. Cela fut démontré une première fois par la stimulation *in vitro* de l'épissage de l'intron D de l'hormone de croissance bovine (bGH) par SRSF1 suite à la liaison de celle-ci à un ESE riche en purines de 115 nt (élément FP) contenu dans le dernier exon, ainsi que par l'accroissement de la liaison d'U2 snRNP au point de branchement en amont de l'exon

cassette EDI de la fibronectine (FN) stimulé par la liaison de protéines SR à un ESE riche en purines de 9 nt situé dans l'exon alternatif (Lavigueur et al. 1993; Sun et al. 1993).

La vaste majorité des facteurs d'épissages sont regroupés au sein de deux grandes familles élargies de facteurs d'épissage, soit les protéines SR et les protéines hnRNPs. Considérant l'existence de près de 900 protéines liant l'ARN ou RBPs et la dualité fonctionnelle de la plupart des facteurs impliqués dans les diverses étapes de la vie d'un ARNm, le nombre de protéines participant à la régulation du processus d'épissage est appelé à grandir dans un futur proche (Castello et al. 2012). Traditionnellement, les membres des deux grandes familles élargies de facteurs d'épissage ont été catalogués au niveau de leur action selon leur appartenance à ces familles comme étant des activateurs (protéines SR) ou répresseurs (protéines hnRNPs) de l'utilisation de sites d'épissage. Cette vision archaïque a été graduellement remplacée par une basée en partie sur la position du site de liaison vis-à-vis celle du site d'épissage ciblé (Kanopka et al. 1996; Erkelenz et al. 2013), mais aussi sur le contexte de l'environnement adjacent qui comprenant entre autres la présence avoisinante de régions régulatrices en cis et des facteurs protéiques trans associés et la force des sites d'épissage régulés. En effet, en présence de sites d'épissage forts, hnRNP L va entraver les transitions nécessaires entre les différentes intermédiaires du spliceosome lors de la catalyse par une stabilisation excessive de l'interaction déjà forte d'U1 et U2 snRNPs à leurs cibles. Dans un contexte de sites faibles, la liaison d'U1 et U2 snRNPs étant faible et donc la stabilisation de celle-ci étant principalement dépendante de l'action de la protéine, hnRNP L ne pose plus d'entraves à la fluidité dynamique du spliceosome et stimule plutôt l'utilisation des sites d'épissage (Motta-Mena et al. 2010).

L'avènement d'outils bio-informatiques d'analyse massive utilisés en combinaison avec le séquençage à haut débit d'ARN isolés via immunoprécipitation par pontage UV ou HIT-CLIP (*high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*) ont permis l'établissement de cartes topographiques illustrant l'activité régulatrice de divers facteurs protéiques en fonction de leur position relativement au site d'épissage qu'ils régulent. De telles cartes ont permis de prédire dans certains cas l'activité de régulation (positive ou négative) de potentiels sites de liaison pour certains facteurs comme les

protéines membres de la famille élargie des protéines hnRNP telles que Nova (Ule et al. 2006; Licatalosi et al. 2008), TDP-43 (Tollervey et al. 2011) et hnRNP I/PTB (Xue et al. 2009; Llorian et al. 2010) ou pour ceux de la famille des protéines SR telles que RBFOX-1 et -2 (Zhang et al. 2008; Venables et al. 2009; Yeo et al. 2009).

La plupart des pré-ARNm encodant des facteurs d'épissage peuvent être épissés de façon alternative, menant ainsi à la production d'isoformes protéiques à activité et localisation variables. Fait intéressant, plusieurs d'entre eux s'autorégulent. L'épissage alternatif du pré-ARNm d'hnRNP A1 produit deux variants, l'isoforme majoritaire A1 (exclusion de l'exon 7B) et l'isoforme A1b peu abondante, mais contenant un domaine riche en glycines plus prolongé (inclusion de l'exon 7B) (Biamonti et al. 1989; Buvoli et al. 1990). De part et d'autre de cet exon alternatif se trouve deux ISS de haute affinité pour hnRNP A1 (Chabot et al. 1997; Blanchette and Chabot 1999). L'isoforme A1b ayant une activité nettement plus réduite que l'isoforme A1, la production rapide et accrue de cette isoforme peu fonctionnelle via cette rétroboucle permet une prompt adaptation des profils d'épissage cibles d'hnRNP A1 face à un stress cellulaire quelconque (Mayeda et al. 1994; Yang et al. 1994). RBFOX-2 entraîne l'exclusion de l'exon 6 en C-terminal de son propre transcrit, menant ainsi la production d'une isoforme inactive (Venables et al. 2009). Du côté des protéines SR classiques, l'épissage alternatif de plusieurs d'entre elles, tel que SRSF1, SRSF3, SRSF5 et SRSF6, peut produire des isoformes au domaine RS tronqué ou inexistant (Ge et al. 1991; Srean et al. 1995; Jumaa et al. 1997; Jumaa and Nielsen 1997).

Plusieurs de ces protéines, dont hnRNP A1, ont la capacité de transiter entre le noyau et le cytoplasme, permettant à celles-ci d'exercer des fonctions extranucléaires (Pinol-Roma and Dreyfuss 1992). Ainsi, outre la régulation de l'épissage alternatif, ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus tels que le contrôle de l'élongation transcriptionnelle (Lin et al. 2008; Pandit et al. 2013; Lemieux et al. 2015) et du processus de NMD (Zhang and Krainer 2004), la stimulation de la traduction (Ostareck et al. 1997; Ostareck-Lederer et al. 1998; Sanford et al. 2004; Swartz et al. 2007; Michlewski et al. 2008), régulation de la stabilité (Kiledjian et al. 1997; Rajagopalan et al. 1998), de la

polyadénylation (Bagga et al. 1998; Moreira et al. 1998) et de l'export du noyau des ARNm (Huang and Steitz 2001) et finalement la stimulation de l'élongation télomérique par la télomérase (LaBranche et al. 1998; Dallaire et al. 2000; Fiset and Chabot 2001; Zhang et al. 2006; Fu and Collins 2007; Lopez de Silanes et al. 2010; Takahama et al. 2013).

2.3.2.1. Protéines SR

Les critères d'appartenance à ce groupe de protéines ont passablement évolué au cours des années. Cette appartenance était initialement basée sur leur reconnaissance par l'anticorps monoclonal mAb104 qui reconnaît un phospho-épitope conservé dans le domaine RS (Roth et al. 1991) et leur capacité à précipiter avec 20 mM de MgCl₂. Une protéine SR classique est maintenant définie comme possédant dans le domaine N-terminal un ou deux domaines de liaison à l'ARN (RBD) qui sont suivis en aval d'un domaine riche en sérines et arginines (RS), comprenant des répétitions de sérines-arginines et possédant au moins 50 acides aminés dont la composition est de plus de 40% en sérines et arginines. L'application de ces critères, combiné au principe que ces protéines doivent avoir un rôle connu dans la régulation de l'épissage alternatif, a permis de restreindre l'adhésion au groupe des protéines SR classiques à une douzaine de membres, renommés récemment SRSF1 à 12 pour une question d'uniformité (Tableau 1) (Manley and Krainer 2010). Plusieurs autres facteurs d'épissage qui ne remplissent pas l'ensemble des critères permettant leur classification comme protéine SR classique tout en ayant un domaine RS sont regroupés sous l'étiquette de protéines *SR-like* et viennent ainsi compléter la grande famille des protéines SR (Lin and Fu 2007; Long and Caceres 2009). Parmi ces protéines *SR-like* se trouve des composantes de la machinerie du spliceosome, à savoir les protéines U1-70k, U2AF35 et U2AF65.

Le domaine RS joue un rôle primordial dans la relocalisation de ces facteurs d'épissage au noyau, plus précisément au niveau des speckles nucléaires, ces compartiments sous-nucléaires hautement dynamiques enrichis en protéines nucléaires dont les facteurs d'épissage qui s'y accumulent particulièrement en situation de choc thermique ou d'arrêt de la transcription (Li and Bingham 1991; Spector and Lamond 2011). De plus, ce domaine RS est l'intermédiaire capital par lequel les membres de cette famille peuvent interagir avec

Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
ASF, SF2, SRp30a	SRSF1
SC35, PR264, SRp30b	SRSF2
SRp20	SRSF3
SRp75	SRSF4
SRp40, HRS	SRSF5
SRp55, B52	SRSF6
9G8	SRSF7
SRp46	SRSF8
SRp30c	SRSF9
TASR1, SRp38, SRp40	SRSF10
p54, SRp54	SRSF11
SRp35	SRSF12

Tableau 1: Nomenclature des protéines SR classiques. Dans la colonne de gauche se trouve les anciens noms usuels des protéines SR classiques et dans la colonne de droite la nouvelle nomenclature correspondante (Manley and Krainer, 2010).

leurs partenaires protéiques, dont certaines composantes du spliceosome (Wu and Maniatis 1993; Amrein et al. 1994; Kohtz et al. 1994). Finalement, cette région est fondamentale à l'interaction avec le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase (ARN pol) II, critère clé au modèle de régulation cotranscriptionnelle de l'épissage alternatif (de la Mata and Kornblihtt 2006; Das et al. 2007). Ces multiples tâches effectuées par le domaine RS expliquent l'importance de son intégrité et l'impact de modifications post-traductionnelles des résidus qui le composent dans la régulation des événements d'épissage alternatif.

L'implication de cette famille de protéines dans l'épissage et la régulation de l'épissage alternatif fut révélée initialement par l'étude de l'impact de SRSF1 sur la sélection de sites en compétition. SRSF1 était un facteur d'épissage auparavant connu comme étant essentiel à la première réaction de transestérification et à la formation subséquente de l'intermédiaire lariat par une stabilisation de l'assemblage du complexe spliceosomal A (Krainer and Maniatis 1985; Krainer et al. 1990). Son ajout à un extrait S100 (inactif pour l'épissage par l'absence de protéines SR) ou nucléaire de cellules HeLa entraîne, dans les cas de sites d'épissage 5' en compétition tels que les transcrits issus de minigènes dérivés de la β -globine humaine ou du virus SV40, l'utilisation majoritaire du site d'épissage proximal (Ge and Manley 1990; Krainer et al. 1990).

2.3.2.2. Protéines hnRNPs

Les protéines hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) tirent leur nom de leur capacité à lier les ARN nucléaires de haut poids moléculaire (*heterogeneous nuclear RNAs*) produits par l'ARN pol II, dont la vaste majorité se sont avérés par la suite comme étant les pré-ARNm (Dreyfuss et al. 1993). Au contraire des protéines SR, les protéines hnRNPs présentent une forte variabilité structurelle. Ces protéines sont parmi les plus abondantes des cellules de vertébrés, à un niveau comparable à celui des histones (Dreyfuss et al. 1993). À l'instar des protéines SR, les membres de cette famille ont une structure modulaire comprenant un ou plusieurs domaines de liaisons à l'ARN, dont les plus fréquents sont le RRM (*RNA recognition motif*) et le domaine KH (*hnRNP K homology*), ainsi qu'un domaine auxiliaire qui module les interactions protéines-protéines (Dreyfuss et al. 1993). Pour une question de classification, nous excluons de la famille hnRNPs les membres possédant à la fois un RRM et un domaine RS caractéristiques des protéines SR. Un ensemble d'environ 24 protéines, allant d'hnRNP A1 à U, constitue le cœur de cette famille de protéines à laquelle a été ajoutée au cours des dernières années plusieurs autres facteurs dont Nova, Sam68, QKI, MBNL, TDP-43, TIA1, TIAR, HuD, HuR, ESRP et CUG-BP et les membres de sa famille (Martinez-Contreras et al. 2007).

La participation directe de la protéine hnRNP A1 dans la régulation de l'épissage alternatif de pré-ARNm fut d'abord démontrée dans des expériences d'épissage *in vitro* via l'ajout en excès d'hnRNP A1, recombinante ou purifiée d'extraits nucléaires de cellules HeLa (cancer du col de l'utérus) à un extrait S100 supplémenté avec la protéine SRSF1. Cet ajout entraîne, dans les cas de sites d'épissage 5' en compétition tels que les transcrits issus de minigènes E1A (adénovirus) ou dérivé de la β -globine humaine, le renversement de l'utilisation majoritaire du site d'épissage proximal prôné par SRSF1 vers l'utilisation du site distal. Cela constitue le premier d'une longue série d'exemples de la relation antagoniste entre ces deux facteurs d'épissage (Mayeda and Krainer 1992). Cette nouvelle fonction fut confirmée *in vivo* une première fois dans la lignée murine érythroleucémique CB3C7 (cellules murines de la rate infectées par le virus leucémique Friend) dans laquelle la faible expression endogène d'hnRNP A1 fut compensée par une surexpression transitoire de la protéine fonctionnelle, entraînant ainsi une production augmentée de l'isoforme 9S du

minigène E1A (adénovirus) par l'utilisation accrue du site d'épissage 5' distal (Yang et al. 1994).

2.3.2.3. Mécanismes de régulation de l'épissage alternatif

Par plusieurs moyens, des facteurs protéiques vont pouvoir favoriser ou réprimer l'utilisation ou la reconnaissance de sites d'épissage par la machinerie du spliceosome. L'action positive ou activatrice est principalement, mais non exclusivement, médiée par les membres de la famille élargie des protéines SR, alors que l'action répressive est principalement, mais non exclusivement modulée par les protéines hnRNPs.

2.3.2.3.1. Recrutement direct de la machinerie du spliceosome

Le premier mécanisme par lequel des facteurs trans peuvent favoriser l'utilisation d'un site d'épissage donné est le recrutement et la stabilisation par interaction protéine-protéine de l'association des diverses composantes du spliceosome, principalement celles des complexes spliceosomaux E et A, à leurs régions clés (Fig. 6A). Par exemple, la liaison de SRSF2 à un ESE situé dans l'exon 16 de la troponine T stimule la liaison de la protéine *SR-like* U2AF à la région riche en pyrimidines et au site d'épissage 3' adjacent (Wang et al. 1995). D'autres exemples incluent le recrutement d'U1 snRNP par SRSF1 via U1-70K et celui tardif de la particule tri-snRNP U4/U6-U5 par les protéines *SR-like* SRp65 et SRp110 (Kohtz et al. 1994; Makarova et al. 2001). À titre d'exemple d'action positive de la part des membres de la famille des hnRNPs, la liaison de la protéine hnRNP-like TIA1 à un ISE (la séquence riche en uridines URI6) présent dans l'intron en aval de l'exon cassette 6 de Fas renforce l'association de U1 snRNP au site d'épissage 5', permettant ainsi l'inclusion de l'exon alternatif et la production de l'isoforme pro-apoptotique de ce récepteur (Izquierdo et al. 2005).

Les facteurs d'épissage peuvent aussi interférer par blocage stérique au niveau de la liaison aux régions clés des composantes du spliceosome, principalement celles des étapes initiales comme U2AF, U1 et U2 snRNPs. Par exemple, le site d'épissage 5' de l'exon IVS3 de la neurofibromine (NF1) voit un équilibre de liaison antagoniste entre la protéine hnRNP H et U1 snRNP. La substitution en position +5 d'une guanine en faveur d'une cytidine (G > C),

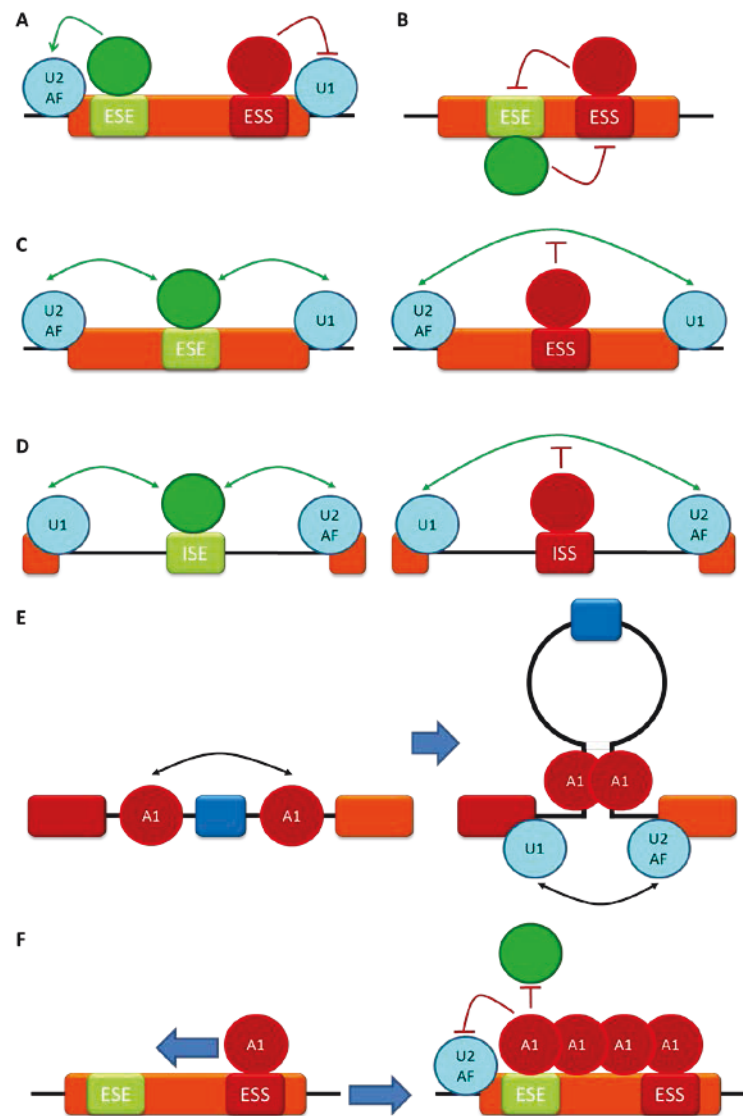


Figure 6: Mécanismes de régulation de l'épissage alternatif par les facteurs protéiques trans. (A) Recrutement direct de la machinerie du spliceosome (B) Altération de l'activité de régions régulatrices et facteurs d'épissage (C) Définition d'exon (D) Définition d'intron (E) Mécanisme de looping-out (F) Multimérisation de facteurs d'épissage.

mutation responsable de la neurofibromatose de type I, fait pencher la balance en faveur de la protéine hnRNP H en réduisant la complémentarité de la séquence avec celle de U1 snRNA. hnRNP H sera ainsi en mesure de déplacer U1 snRNP et d'empêcher l'utilisation de site d'épissage (Buratti et al. 2004). Aussi, la liaison d'hnRNP I/PTB au PPT situé en amont de l'exon 3 chez l' α -tropomyosine du rat et celle de SRSF1 à un ISI (3RE) situé dans la région majeure tardive L1 (*major late region L1*) de l'adénovirus entrave le

recrutement respectivement d'U2AF65 et d'U2 snRNP (Lin and Patton 1995; Kanopka et al. 1996).

2.3.2.3.2. Altération de l'activité de régions régulatrices et facteurs d'épissage

De manière indirecte, un facteur protéique peut accroître l'utilisation d'un site d'épissage en entravant le recrutement d'un répresseur au travers d'une compétition pour un site de liaison commun (Fig. 6B). Outre par un encombrement stérique, un facteur peut masquer son antagoniste protéique via une interaction protéine-protéine. Ce mécanisme peut être vu comme une balance dont l'action sur l'utilisation des sites d'épissage dépendra de l'orientation que prendra le ratio entre les deux facteurs en compétition. Le cas d'hnRNP A1 avec SRSF1 cité auparavant est l'exemple classique de la relation antagoniste que peut entretenir deux facteurs d'épissage.

Par exemple, l'exon 2 de tat situé au sein du pré-ARNm de VIH-1 contient deux régions régulatrices qui se chevauchent. L'une répressive, ESS2, peut être liée par la protéine hnRNP A1, alors que l'autre activatrice, ESE2, contient un site de liaison pour la protéine SRSF2. Ainsi, par ce chevauchement, la liaison de SRSF2 et l'inclusion subséquente de l'exon 2 de tat dans le produit final se trouvent inhibés lorsqu'hnRNP A1 se lie au site ESS2 (Zahler et al. 2004). Une SRSF10 déphosphorylée s'associe à la protéine U1-70k, empêchant l'interaction et la stabilisation par celle-ci de la liaison du snRNP U1 au site d'épissage 5' (Shin et al. 2004). D'autres exemples de compétition incluent SRSF1 et 2 en amont de l'exon alternatif 6A de la β -tropomyosine et hnRNP L et SRSF1 au niveau de l'exon 5 de CD45 (Gallego et al. 1997; Motta-Mena et al. 2010).

2.3.2.3.3. Contrôle de la transition entre les différents intermédiaires du spliceosome

Ce même hnRNP L, au niveau de l'exon 4 de CD45 cette fois, est au cœur d'un autre mécanisme original de répression. Dans ce contexte, hnRNP L n'agit pas en contrant l'action d'un activateur ou en empêchant la liaison des composantes du spliceosome, mais plutôt au travers de la formation d'un complexe spliceosomal A inactif. En effet, suite à sa liaison au motif ARS dans l'élément exonique ESS1, hnRNP L va stabiliser l'interaction d'U1 et U2 snRNPs aux sites d'épissage 5' et 3' respectivement qui entourent l'exon 4 de

CD45. Cette stabilisation excessive va cependant bloquer le spliceosome sous la conformation du complexe A en favorisant l'interaction entre elles de ses composantes au travers de l'exon (définition d'exon), entravant ainsi la transition à la définition d'intron nécessaire à la formation du complexe B. L'exon 4 aux prises avec un complexe spliceosomal inactif sera en quelque sorte intronisé et exclu de l'ARNm (House and Lynch 2006; Motta-Mena et al. 2010).

2.3.2.3.4. Définition d'exon et d'intron

Un autre mécanisme par lequel les protéines peuvent favoriser l'utilisation de sites d'épissage est en jouant le rôle de relais de transmission dans la communication entre les composantes du spliceosome souvent séparées de plusieurs kilobases, facilitant ainsi l'assemblage d'un complexe fonctionnel en un lieu donné. Cette communication peut s'effectuer au travers de l'exon ou de l'intron, soit les définitions d'exon et d'intron mentionnées précédemment (Fig. 6C et 6D). L'immunodéplétion de SRSF2 empêche à la fois l'immunoprécipitation *in vitro* de fragments d'ARN contenant les régions introniques clés en 3' par U1 snRNP et l'association d'U2 snRNP à ces régions. Ainsi, SRSF2, sans affecter la capacité de liaison d'U1 snRNP au site d'épissage 5', renforce la stabilisation par celui-ci de l'interaction entre U2 snRNP et le site de branchement, et donc l'assemblage de l'intermédiaire spliceosomal A (Fu and Maniatis 1992). SRSF1 et SRSF2 pouvant s'associer entre elles et avec les protéines *SR-like* U1-70K et U2AF35, ces facteurs d'épissage pourraient, sous la forme d'homodimère ou hétérodimère, permettre une stabilisation accrue de la liaison d'U2AF64 au PPT et le rapprochement des deux sites d'épissage opposés (Wu and Maniatis 1993).

Cette communication entre les composantes de ce complexe peut aussi être inhibée par des facteurs protéiques qui cherchent à réprimer la formation d'un spliceosome fonctionnel. Ainsi, la liaison d'hnRNP I/PTB à un ISS dans l'intron situé entre l'exon cassette N1 et l'exon 4 constitutif de c-Src inhibe l'inclusion de l'exon alternatif. Cette répression ne découle pas de l'inhibition de la reconnaissance du site d'épissage 5' par U1 snRNP, mais plutôt de l'inhibition de l'assemblage du complexe spliceosomal E par interférence dans la communication entre U1 et U2AF65 liée au PPT de ce même intron (définition d'intron).

PTB n'agit pas directement sur l'activité d'U2AF65 puisque cette hnRNP ne bloque pas sa capacité à interagir et à former le complexe E avec U1 snRNP située sur le site d'épissage 5' de l'intron en amont de l'exon cassette, résultant en l'excision de l'exon alternatif (Sharma et al. 2005). Ce même PTB peut aussi interférer dans la transition entre les différents intermédiaires du spliceosome en bloquant la communication au travers des exons ou la définition d'exon. En effet, la liaison de PTB à un ESS (la séquence riche en uridines URE6) situé en plein de cœur de l'exon alternatif 6 de Fas empêche l'incorporation de celui-ci dans l'ARNm mature. À l'instar de l'exemple de c-Src, la liaison de PTB ne bloque pas l'association d'U1 snRNP au site d'épissage 5' de l'exon cassette, mais plutôt déstabilise celle d'U2AF65 au PPT de l'intron en amont. Le fait que l'action répressive de PTB sur cette liaison nécessite l'association d'U1 snRNP au site d'épissage réfute l'hypothèse d'une action directe sur U2AF65 en faveur de celle d'une authentique inhibition de la définition d'exon (Izquierdo et al. 2005).

2.3.2.3.5. Mécanisme de looping-out

La présence, de part et d'autre de l'exon cassette N1 de c-Src, de multiples sites de liaisons pour PTB a généré l'hypothèse comme quoi ce facteur régule la répression de cet exon alternatif par le mécanisme de looping-out (Fig. 6E) (Chou et al. 2000; Wagner and Garcia-Blanco 2001). Le mécanisme, dont notre laboratoire est l'instigateur de la découverte, consiste en la séquestration d'un exon cassette dans une boucle inter-intronique formée par des interactions homo- ou hétérodimériques entre facteurs protéiques liés à des régions régulatrices placées dans les introns ceinturant l'exon alternatif (Fisette et al. 2010). Cette séquestration spatiale entrave une communication efficace entre les composantes du spliceosome, empêchant ainsi la formation de complexes spliceosomaux fonctionnels enjambant ces introns. Cette boucle rapproche le site d'épissage 5' de l'intron en amont avec le site d'épissage 3' de l'intron en aval, permettant donc la formation d'un spliceosome opérationnel inter-intronique et par conséquent, l'exclusion de l'exon cassette. Cette séquestration peut résulter de l'action d'une seule protéine possédant de multiples domaines de liaison à l'ARN ou de la formation d'une structure secondaire de l'ARN inter-intronique par appariement de séquences complémentaires (Nasim et al. 2002). Ce mécanisme fut d'abord découvert par l'action d'hnRNP A1 sur la régulation de l'épissage

alternatif de son propre pré-ARNm (Chabot et al. 1997; Blanchette and Chabot 1999; Nasim et al. 2002). L'exon alternatif 7B d'hnRNP A1 est entouré de deux ISS, CE1 en amont et CE4 en aval. Ces deux ISS sont liés par la protéine hnRNP A1 et n'altèrent pas la capacité d'U1 snRNP à reconnaître et lier le site d'épissage 5' de l'exon 7B (Chabot et al. 1997; Blanchette and Chabot 1999). L'exclusion de l'exon 7B nécessite la présence simultanée d'hnRNP A1 aux ISS et une capacité d'interaction protéique intacte de la part de ces facteurs (Blanchette and Chabot 1999). Ce mécanisme peut aussi influencer positivement la formation d'un spliceosome. En effet, la formation d'une boucle intra-intronique peut faciliter l'assemblage du spliceosome en réduisant considérablement par rapprochement la distance séparant les régions essentielles à la catalyse de la réaction d'épissage, juxtaposant ainsi les sites d'épissage, le point de branchement et le PPT. L'insertion commune de deux sites de liaison pour les protéines hnRNP A1 ou hnRNP F et H placés aux antipodes d'un grand intron accroît l'efficacité d'épissage *in vitro* de minigènes autrement faiblement épissés (Martinez-Contreras et al. 2006).

2.3.2.3.6. Multimérisation de facteurs d'épissage

La nucléation, ou multimérisation de protéines le long du pré-ARNm, est un autre mécanisme qui réprime la production de certaines isoformes (Fig. 6F). Celle-ci débute avec l'interaction initiale d'une protéine avec un site de haute affinité. Cette forte interaction constituera un point d'ancrage solide qui permettra, par interactions coopératives homophiliques, l'association des mêmes facteurs à des sites voisins d'affinité plus faible et ainsi engendra une propagation de ceux-ci sur le transcrit. Cette couverture va donc bloquer l'accessibilité à certaines régions régulatrices clés ou sites d'épissage. Au niveau de l'exon 3 de tat (VIH-1), hnRNP A1 lie l'élément ESS3, un répresseur de l'inclusion de l'exon alternatif. Cette première hnRNP A1 liée va stabiliser la liaison d'autres hnRNP A1 à des sites plus faibles par des interactions protéines-protéines médiées via leur domaine C-terminal riche en glycines. Cette propagation, qui peut être contrée par la liaison à un site exonique de SRSF1, va se poursuivre en direction d'ESS2, un autre ESS situé en amont d'ESS3. Cela amènera le blocage de la liaison de l'activateur SRSF2 à l'exon 3, inhibant ainsi l'excision de l'intron en 5' et l'inclusion de l'exon cassette du produit mature (Zhu et al. 2001).

2.3.2.3.7. Altération de la structure secondaire de l'ARN

L'existence *in vivo* de structures secondaires au sein des pré-ARNm dépend d'une fenêtre d'opportunité où l'ARN est libre suffisamment longtemps pour permettre un appariement avec une séquence complémentaire. Ainsi, la formation de ces structures est en compétition directe avec la liaison de RBPs à l'ARN et dépend de la vitesse à laquelle celles-ci sont déposées sur le pré-ARNm. À titre d'exemple, la liaison de la protéine hnRNP F à l'élément B2G de Bcl-x, un petit régulateur apoptotique, prévient possiblement la formation à cet endroit d'une tige-boucle répressive de l'utilisation du site d'épissage 5' de l'isoforme courte pro-apoptotique Bcl-xS (Garneau et al. 2005; Dominguez et al. 2010).

2.3.2.4. Modifications post-traductionnelles

À l'instar de l'ensemble des protéines, les facteurs d'épissage sont assujettis à des modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, méthylation, sumoylation, etc.). Ces modifications post-traductionnelles ont le potentiel d'affecter leur activité, expression et localisation intracellulaire. Parmi celles-ci, la phosphorylation des facteurs d'épissage est celle dont l'impact est le mieux compris et étudié. En effet, la progression au travers des différents intermédiaires du complexe spliceosomal qui mènera à la catalyse de la réaction d'épissage nécessite divers cycles activateurs de phosphorylation et de déphosphorylation principalement effectués au niveau du domaine riche en sérines des protéines SR et *SR-like* (Mermoud et al. 1992; Tazi et al. 1992; Tazi et al. 1993; Gui et al. 1994; Mermoud et al. 1994; Roscigno and Garcia-Blanco 1995; Xiao and Manley 1998; Prasad et al. 1999). À titre d'exemple, la production d'une U1-70K phosphorylée résistante à la déphosphorylation abolit les deux réactions de transestérifications au cœur du processus d'épissage (Tazi et al. 1993). À l'inverse, la phosphorylation du domaine RS de SRSF1 par Clk/Sty, SRPK1 ou 2 accroît son association avec U1-70K, et par extension avec U1 snRNP (Xiao and Manley 1997; Wang et al. 1998).

Cette phosphorylation du domaine RS des protéines SR est modulée par diverses kinases dont les plus importantes sont Clk/Sty (4 isoformes), SRPK1 et 2, la topoisomérase I et CDK1 (Gui et al. 1994; Colwill et al. 1996; Rossi et al. 1996; Nayler et al. 1997; Okamoto

et al. 1998; Wang et al. 1998). La phosphorylation des sérines entraîne une redistribution des protéines SR, faisant passer celles-ci d'une concentration au niveau du speckle nucléaire à une distribution diffuse au sein du nucléoplasme et voire même à l'expulsion du noyau (Gui et al. 1994; Colwill et al. 1996; Wang et al. 1998). Par exemple, la phosphorylation de Sam68 module son activité au travers d'une rétention de la protéine phosphorylée au cytoplasme (Matter et al. 2002; Lukong et al. 2005; Lukong et al. 2009). La déphosphorylation des protéines SR, quant à elle, est principalement modulée par les phosphatases PP1 et PP2A (Mermoud et al. 1992; Mermoud et al. 1994; Misteli and Spector 1996; Misteli 1999; Shi and Manley 2007).

Au niveau de la régulation du processus d'épissage alternatif, la phosphorylation de protéines SR par Clk/Sty altère, dans des essais d'épissage *in vitro*, leur régulation de l'utilisation de site d'épissage 5' en compétition (Prasad et al. 1999). La stimulation de l'utilisation d'un site d'épissage 3' faible du pré-ARNm de tat nécessite la phosphorylation de SRSF1 (Xiao and Manley 1998). La phosphatase sérines/thréonines PP1 inhibe la stimulation promue par des protéines SR de l'utilisation préférentielle du site d'épissage proximal présent dans diverses situations de site d'épissage 5' en compétition (Cardinali et al. 1994). Ces situations illustrent l'importance de la régulation de la phosphorylation pour l'activité des facteurs d'épissage. La phosphorylation du domaine RS semble accroître la spécificité de liaison ou sélectivité au niveau des séquences ou motifs d'ARN reconnus par les protéines SR (Tacke et al. 1997; Xiao and Manley 1997). À l'inverse, dans certains cas, la déphosphorylation des facteurs d'épissage peut stimuler l'activité régulatrice de ces protéines. L'induction de l'action répressive de la protéine SR SRSF10 vis-à-vis la formation du complexe spliceosomal A nécessite au préalable une déphosphorylation activatrice au niveau du domaine riche en sérines (Shin and Manley 2002).

Du côté des protéines hnRNPs, la phosphorylation (réversible par PP2A) d'hnRNP A1 par diverses kinases sérines/thréonines réduit sa capacité à lier les polynucléotides d'ADN et d'ARN et a altéré son transport intracellulaire, résultant en son accumulation au niveau du cytoplasme (Idriss et al. 1994; Municio et al. 1995; van der Houven van Oordt et al. 2000; Allemand et al. 2005; Guil et al. 2006; Shimada et al. 2009). Cette relocalisation

cytoplasmique s'accompagne d'un impact concret sur la régulation d'événements d'épissage alternatif (van der Houven van Oordt et al. 2000).

Peu est connu de l'impact des autres modifications post-traductionnelles possibles sur la régulation de l'épissage alternatif. L'acétylation accroît la stabilité et prévient la dégradation de plusieurs membres de la famille des protéines hnRNPs (F, H, A1, I et L) par le protéasome (Koumbadinga et al. 2015). Au contraire, dans certains cas comme pour SRSF2, l'acétylation des lysines guide le facteur d'épissage vers sa dégradation par le protéasome (Edmond et al. 2011). Outre par une redirection vers le protéasome (Moulton et al. 2014), l'ubiquitination des lysines d'un facteur d'épissage peut altérer son activité de manière indépendante de la dégradation en diminuant par exemple sa capacité de liaison à l'ARN cible (Zhou et al. 2013; Moulton et al. 2014). L'ubiquitination est aussi essentielle au maintien de la particule triple snRNPs (U4/U5/U6) en empêchant la dissociation de U4/U6 (Bellare et al. 2008).

2.3.2.5. Signalisation cellulaire

Un facteur encore sous-étudié est l'impact de la signalisation cellulaire ou comment un stimulus externe ou un stress peut influencer l'épissage alternatif d'un pré-ARNm. Sachant qu'une cellule est bombardée au quotidien par de multiples stimuli ou doit faire face à des situations où celle-ci doit adapter rapidement son réservoir de protéines pour assurer sa survie et le bon déroulement de son homéostasie, l'importance d'étudier le couplage entre signalisation cellulaire et régulation de l'épissage est facilement concevable. L'implication de la signalisation cellulaire dans la régulation de l'épissage alternatif se manifestera principalement au travers d'une régulation de l'expression de facteurs d'épissage ou de l'induction de modifications post-traductionnelles affectant l'activité et la localisation de ceux-ci.

Il existe quelques exemples bien caractérisés où on retrouve ce couplage et l'un de ceux-ci est au niveau du transcrit CD44. CD44 est une glycoprotéine de surface transmembranaire impliquée dans la prolifération, survie et différenciation cellulaire, en plus de jouer un rôle dans la réponse immunitaire. Le pré-ARNm de CD44 contient 20 exons dont 10 exons

cassettes alternatifs (identifiés v1 à v10) situés entre les exons constitutifs 5 et 6 (Ponta et al. 2003). Prenons le cas d'un lymphocyte T qui, suite à une infection, doit se multiplier. Suite à l'activation des lymphocytes T ou de l'oncogène Ras dans les lymphomes de cellules T, l'exon cassette v5 est inclus dans l'ARNm de CD44 au travers de l'action de la cascade de signalisation Ras–Raf–MEK–ERK (Downward et al. 1990; Weg-Remers et al. 2001; Matter et al. 2002). Ainsi, dans les cellules EL4 (lymphome murin de cellules T), l'inactivation de l'expression de la protéine Sam68 ou la prévention de sa phosphorylation médiée par la kinase ERK1/2 via la mutation d'acides aminés cibles (sérine 58 et thréonines 71 et 84) réduit l'inclusion accrue de l'exon cassette v5 au sein de l'ARNm mature de CD44 médiée par l'activation de la cascade de signalisation ERK/MAP (Matter et al. 2002). Une protéine Sam68 phosphorylée contrebalancerait la répression de l'inclusion de l'exon cassette v5 médiée par la protéine hnRNP A1 (Matter et al. 2000). Autre exemple illustre comment un changement dans les propriétés mécaniques du microenvironnement cellulaire peut entraîner une altération du profil d'épissage de certains événements clés. L'accroissement de la rigidité de la matrice extracellulaire, une situation telle que présente au sein du microenvironnement de la plupart des tumeurs solides, favorise la production de l'isoforme pro-angiogénique de la fibronectine (EDB-FN) au travers d'une phosphorylation accrue de protéines SR, possiblement SRSF5, qui découle de l'activation de la cascade de signalisation PI3K-AKT (Bordeleau et al. 2015).

L'accomplissement du cycle cellulaire est l'une de ces situations où la cellule devra adapter la régulation de l'épissage alternatif de certains événements primordiaux au travers des différentes phases menant à l'achèvement de ce cycle. Lors de la phase mitotique du cycle cellulaire, l'épissage des pré-ARNm, à l'instar des autres processus d'expression génique et de maturation des ARNm, doit être réprimé. Cette répression de l'épissage semble être médiée en partie par la protéine SRSF10 qui, lors de la mitose cellulaire, subit une déphosphorylation activatrice (Shin and Manley 2002). Lors de la métaphase, les domaines RS des protéines SR telles que SRSF2 et SRSF1 sont hyperphosphorylés comparativement à l'interphase, entraînant une dissolution des speckles nucléaires et redistribution de ces facteurs d'épissage. Cette phosphorylation régulée par le cycle cellulaire est induite par SRPK1 dont l'activité est accrue dans la métaphase (Gui et al. 1994). Finalement, l'aurore

kinase A (AURKA), une kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, réduit l'expression protéique de SRSF1 (Moore et al. 2010; Wang and Silver 2010).

L'induction de stress thermiques, osmotiques, génotoxiques et oxydatifs dans l'environnement cellulaire peut mener à une altération de la régulation en général ou ciblée de l'épissage. L'imposition d'un choc thermique aux cellules entraîne une répression générale de l'épissage (Yost and Lindquist 1986). Comme au niveau de la phase mitotique du cycle cellulaire, une déphosphorylation du domaine riche en sérines de la protéine SRSF10 serait impliquée dans cette répression générale de l'épissage (Shin et al. 2004; Shi and Manley 2007). L'induction de stress entraîne la formation de granules de stress transitoires au niveau du noyau et au sein du cytoplasme (qui comporte des ARNm en arrêt de traduction) dans lesquelles seront redirigés les facteurs d'épissage. Face à un stress thermique ou osmotique ou à une exposition aux rayons UV-C, l'activation de la voie de signalisation p38 MAP kinase induit l'accumulation et la relocalisation de la protéine hnRNP A1 aux granules de stress cytoplasmiques par la perte de son interaction avec sa transportine des suites de sa phosphorylation induite par les kinases Mnk 1 et 2 (van der Houven van Oordt et al. 2000; Allemand et al. 2005; Guil et al. 2006).

L'intégrité génomique est continuellement menacée par divers facteurs internes et externes. Une altération à l'intégrité du génome, comme des mutations ou des réarrangements chromosomiques est l'une des principales étiologies de diverses pathologies humaines. Les cellules ont par conséquent développé des mécanismes de détection et de réparation de toute atteinte génétique qui collectivement constituent la voie ou cascade de réponse aux dommages à l'ADN (DDR). La résolution de ce stress génotoxique nécessitera un important remodelage de la régulation du profil d'épissage de nombreux médiateurs critiques de la voie de la DDR. Ce remodelage de la régulation de l'épissage alternatif par l'activation de la DDR ou l'induction de dommages à l'ADN découle d'une modification de l'expression ou de l'activité de diverses RBPs. À titre d'exemple, l'utilisation de camptothécine, un inducteur de stress génotoxiques par l'inhibition de la topoisomérase I, mène à l'exclusion de nombreux exons (particulièrement l'exon E5) de l'ARNm de MDM2, une ligase d'ubiquitines, des suites d'une réduction du recrutement du facteur

d'épissage YB-1 par une perte de son interaction avec la protéine EWS associée à l'ARN pol II. La production de ces isoformes entraîne une réduction du niveau d'expression de cette ligase d'ubiquitines, permettant une accumulation du facteur transcriptionnel p53 qui est au cœur de la DDR par une réduction de sa dégradation par le protéasome (Dutertre et al. 2010). L'induction de la DDR va altérer le profil de modifications post-traductionnelles de nombreux facteurs, plusieurs d'entre eux étant la cible directe de kinases telles que ATM, ATR et CHK2 (Matsuoka et al. 2007; Stokes et al. 2007; Akaike et al. 2014) ou de phosphatases activées par la DDR (Shkreta et al. 2011).

2.3.2.6. Patron d'expression tissulaire

Les études de séquençage à haut débit du transcriptome ont permis d'observer que le profil d'épissage d'une majorité d'événements varie d'un tissu à l'autre (estimation de 52 à 80 % des événements d'épissage), soulignant l'existence d'une régulation différentielle ou spécifique au tissu étudié (Wang et al. 2008). Cette divergence permet d'expliquer les résultats parfois contradictoires obtenus au niveau d'une même unité d'épissage entre diverses études employant différentes lignées cellulaires. À titre d'exemple, l'étude de l'impact de la réduction de l'expression de 14 membres de la famille de protéines hnRNP par ARN interférence (ARNi) sur la régulation de l'épissage alternatif de 56 événements apoptotiques montre que seule une faible portion de ceux-ci (10 événements) voit leur ratio d'isoformes produites altéré de manière identique par la déplétion d'une protéine donnée dans les trois lignées cellulaires étudiées. Par exemple, dans le cas d'un exon cassette de l'unité PCBP4, la déplétion de la protéine hnRNP F dans deux lignées produit un résultat totalement opposé : inclusion dans les PC3 (adénocarcinome de grade IV issu de la prostate), exclusion dans les fibroblastes BJT (Venables et al. 2008).

La régulation de l'épissage alternatif est donc spécifique au type et à l'état des cellules étudiées. Les profils d'épissage alternatif peuvent ainsi constituer la signature propre d'identification des tissus. En effet, les ratios d'isoformes produites pour certains événements d'épissage alternatif varient grandement entre les tissus sains et cancéreux, et même entre les différents grades tumoraux. Les profils d'épissage peuvent ainsi servir de marqueurs d'identification et de gradation qui faciliteraient et orienteraient l'approche

thérapeutique (Gardina et al. 2006; Klinck et al. 2008; Venables et al. 2008; Venables et al. 2009). L'étude des événements d'épissage dans les tissus (sains ou cancéreux) est d'autant plus complexe que ceux-ci sont un amalgame de différents types cellulaires ayant leur propre régulation des profils d'épissage. Une partie de l'explication de cette divergence entre les tissus (ou types cellulaires) au niveau de la régulation des profils d'épissage est centrée autour des facteurs d'épissage protéiques.

Un contrôle différentiel de l'expression des facteurs d'épissage participe à la particularité tissulaire des profils d'épissage et par conséquent, à la spécialisation des tissus. À titre d'exemple, la protéine SR répressive SRSF10 est fortement exprimée au niveau des ovaires, des testicules, de l'utérus, du cerveau et des poumons, mais est peu exprimée au niveau du cœur, des reins et du foie (Shin and Manley 2002). Au sein du foie, SRSF9 voit son expression augmentée, alors que SRSF11, hnRNP A2/B1 et SRSF5 voient la leur réduite comparativement à leur situation dans les autres tissus humains (Yeo et al. 2004). Plusieurs de ces facteurs d'épissage voient leur expression changée dans les tissus malins comparativement à celle dans les tissus sains (Pino et al. 2003; Grosso et al. 2008). Sam68, comparativement à son niveau d'expression dans les cellules non transformées ou tissus sains, est surexprimée dans les cellules cancéreuses ou tissus malins tels qu'au niveau du carcinome de la prostate (Busa et al. 2007). Au contraire, la protéine RBFOX-2 voit son expression réduite dans les tumeurs ovariennes (Venables et al. 2009). Le niveau d'expression de la protéine hnRNP A1 est augmenté dans la plupart des cellules prolifératives ou transformées telles que celles du cancer du poumon à ou non à petites cellules (SCLC ou NSCLC), de la leucémie myélogénique chronique ou d'oligodendrogliomes (Biamonti et al. 1993; Xu et al. 2001; Iervolino et al. 2002; Patry et al. 2003; Pino et al. 2003). La surexpression de SRSF1, un proto-oncogène, induit la production d'une isoforme constitutivement active de la kinase RON (exclusion de l'exon 11) et d'une isoforme oncogénique de la protéine ribosomale S6K1, toutes deux critiques à la transformation et au caractère invasif agressif des cellules cancéreuses (Ghigna et al. 2005; Karni et al. 2007).

Certaines protéines ne sont exprimées que dans certains types cellulaires particuliers. Parmi celles-ci, Nova-1 et -2, membres de la famille des protéines hnRNP et facteurs d'épissage essentiels à la survie des neurones, sont exprimées spécifiquement dans ces tissus neuronaux (Buckanovich et al. 1993; Jensen et al. 2000). nPTB, un paralogue légèrement plus long d'hnRNP I/PTB (73% d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés) est exprimé au sein des cellules neuronales, et dans une moindre mesure chez les cellules cardiaques, gliales et de testicules. Malgré l'homologie, les deux paralogues ont une certaine divergence au niveau de leurs propriétés; la force d'association de nPTB à son motif de liaison est plus forte que son paralogue bien que nPTB a une activité répressive plus faible que PTB auprès de l'inclusion de l'exon N1 de c-src (Markovtsov et al. 2000; Polydorides et al. 2000). Les protéines ESRP 1 et 2 (Epithelial Splicing Regulatory Proteins) sont uniquement exprimées dans les cellules épithéliales, expression qui est réduite lors de la transition épithéliale mésenchymateuse, et critique à la production de l'isoforme épithéliale (comprenant l'exon IIIb) du récepteur FGFR2 (Warzecha et al. 2009). Parmi d'autres protéines avec un profil d'expression tissulaire restrictif se trouvent quaking ou QKI (musculaires), RBFOX-1 (cardiaques, neuronaux et musculaires), la protéine *SR-like* nSR100 (neuronaux) et certains membres des familles Hu (neuronaux) et CELF-CUG-BP (neuronaux) (Ladd et al. 2001; Jin et al. 2003; Nakahata and Kawamoto 2005; Underwood et al. 2005; Zhu et al. 2006; Calarco et al. 2009; Hall et al. 2013).

Finalement, une altération de l'activité des facteurs d'épissage peut expliquer la différence de régulation des événements d'épissage alternatifs entre les différents types cellulaires. Cette altération de l'activité peut découler d'un changement de production des différentes isoformes de facteurs d'épissage ou d'un profil différent de modifications post-traductionnelles. La production d'une isoforme inactive de RBFOX-2 manquant l'exon 6 est accrue dans les tissus malins du sein (Venables et al. 2009). La sélection entre deux exons mutuellement exclusifs présents dans les pré-ARNm de RBFOX-1 et -2 entraîne la production d'isoformes spécifiques au tissu étudié (incorporation de B40 dans le cerveau et de M43 chez les cellules musculaires squelettiques et cardiaques) et avec une activité régulatrice de l'épissage différente (l'isoforme comprenant B40 favorise l'inclusion de l'exon cassette N30 de la chaîne lourde II-B de myosine non musculaire, contrairement à

l'isoforme musculaire) (Nakahata and Kawamoto 2005). Lors du développement cardiaque, le ratio des isoformes de la protéine ETR-3, un membre de la famille de protéines CELF/CUGBP, va évoluer d'une situation de production majoritaire de l'isoforme longue dans les cellules embryonnaires vers une de production majoritaire de l'isoforme courte dans les cellules matures, situation qui corrèle avec la transition vers l'exclusion de l'exon 5 dans le pré-ARNm de la troponine T cardiaque (Ladd et al. 2001). La distribution intracellulaire des facteurs d'épissage peut aussi varier d'un type cellulaire à l'autre. La protéine hnRNP A1 se retrouve concentrée au noyau dans les cellules tumorales pulmonaires (NSCLC et SCLC), alors que son homologue hnRNP A2 est relocalisée principalement au cytoplasme (Pino et al. 2003).

2.4. Régulation cotranscriptionnelle

L'observation par microscopie électronique de la formation de boucles d'ARN introniques sur le transcrit naissant dans les embryons de drosophile est venue chambouler l'idée préconçue de la compartimentation des différentes étapes menant de la synthèse d'un transcrit à sa traduction (Beyer and Osheim 1988). L'existence d'un pré-ARNm complet non coiffé libre dans le noyau n'est donc possiblement qu'un concept abstrait non existant *in vivo*. Considérant le fait que l'ARN pol II synthétise environ 3,8 kilobases par minute, que plusieurs locus humains comprennent plus de 100 kilobases et que l'excision d'un intron ou exon prend 5 à 10 minutes suite à la synthèse du site d'épissage 3', l'idée que les processus de transcription et d'épissage soient simultanés était plausible et facilement concevable (Singh and Padgett 2009). Cependant, un lien fonctionnel bidirectionnel entre ceux-ci restait à prouver. Un premier indice de l'existence de ce couplage fut la découverte que l'emploi d'un ARN pol II tronquée de son domaine C-terminal entraîne un défaut de terminaison de la transcription, de polyadénylation, d'ajout de coiffe, mais surtout, d'épissage de l'intron 2 de la β -globine (McCracken et al. 1997; McCracken et al. 1997). Le domaine C-terminal ou CTD, la plus grande sous-unité de l'ARN pol II, contient une série de répétitions (26 à 29 chez la levure, 52 chez les mammifères) de sept acides aminés; tyrosine-sérine-proline-thréonine-sérine-proline-sérine (ou YSPTSPS) dont le statut de phosphorylation de certains résidus a un impact majeur sur l'initiation et l'élongation transcriptionnelle. La phosphorylation de la sérine 5 par le facteur de transcription TFIIH

initie le processus de transcription, phosphorylation qui sera graduellement remplacée lors de la progression de la polymérase sur le brin transcrit par la phosphorylation de la sérine 2 activatrice d'une élongation efficace (Kornblihtt 2006). Indice d'une communication fonctionnelle entre les deux machineries, une CTD hyperphosphorylée s'associe avec la particule tri-snRNPs U4-U5-U6 du spliceosome. (Chabot et al. 1995; Vincent et al. 1996). De plus, des essais d'immunoprécipitations avec comme substrat la polymérase ont permis de récupérer l'ensemble des composantes protéines d'U1 snRNP, ainsi que plusieurs membres de la famille des protéines SR telles que Tra2 α et β et SRSF1, 3, 4, 5, 6 et 7. L'incapacité des protéines SR d'influencer la régulation de l'épissage alternatif si ajoutées postérieurement à l'activation de la transcription dans des essais *in vitro* souligne l'importance du recrutement cotranscriptionnel dans leur activité (Das et al. 2007). Finalement, l'abolition de l'inclusion de l'exon cassette EDI de FN induite par SRSF3 suite à la délétion de CTD est un exemple concret du couplage fonctionnel d'un événement d'épissage alternatif particulier (de la Mata and Kornblihtt 2006).

L'ensemble de ces observations a mené à l'établissement de deux modèles non mutuellement exclusifs pouvant expliquer le mécanisme par lequel le processus de transcription a un impact sur celui de l'épissage : le modèle cinétique et le modèle de recrutement (Kornblihtt 2007). Dans un premier temps, selon le modèle cinétique, la vitesse d'élongation transcriptionnelle peut influencer la sélection des sites d'épissage en altérant la compétition entre ceux-ci et les régions régulatrices pour le recrutement des composantes du spliceosome et des facteurs d'épissage (Fig. 7). L'importance du contrôle de l'élongation transcriptionnelle dans la régulation de l'épissage alternatif fut d'abord démontrée par l'utilisation d'une polymérase mutée dont sa vitesse de synthèse des transcrits s'en trouvait réduite ou de DRB, un inhibiteur de l'élongation transcriptionnelle par l'ARN pol II (inhibe p-TEFb). Ainsi, cette altération de la vitesse de transcription va favoriser l'inclusion de l'exon cassette EDI dans un minigène de FN. Le site d'épissage 3' de l'intron en amont de l'exon cassette étant plus faible, plus éloigné de la séquence consensus que celui de l'intron en aval, la réduction de la vitesse d'élongation abolit donc cette compétition et accorde ainsi suffisamment de temps pour la reconnaissance et l'assemblage des composantes du spliceosome au niveau de cet intron dont l'excision va

assurer l'inclusion de l'exon alternatif (Nogues et al. 2002; de la Mata et al. 2003; Nogues et al. 2003). Cette présentation prolongée des régions régulatrices peut, selon le contexte, accroître l'inclusion de certaines portions du pré-ARNm, à l'instar de l'exon EDI de FN (de la Mata et al. 2003), mais tout aussi bien favoriser leur exclusion en fournissant le temps

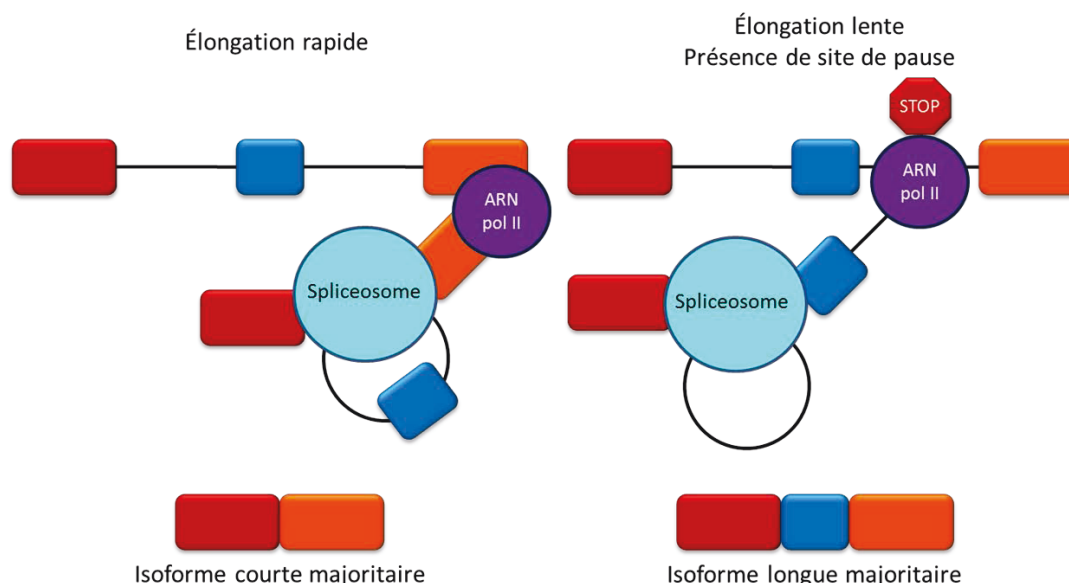


Figure 7: Modèle cinétique de la régulation cotranscriptionnelle de l'épissage alternatif. Le site d'épissage accepteur de l'exon cassette est plus faible que celui situé en aval. Ainsi, la présence de site de pause pour la polymérase ou une vitesse d'élongation lente favorise l'inclusion de l'exon cassette alors qu'une vitesse d'élongation rapide favorise l'exclusion (Adapté de Kornblihtt 2007).

nécessaire à l'association de protéines régulatrices inhibitrices à leurs éléments cibles. La présence de sites de pause pour l'ARN pol II peut, selon le même modèle, aussi influencer la sélection des sites d'épissage (Roberts et al. 1998; Robson-Dixon and Garcia-Blanco 2004; Montes et al. 2012; Montes et al. 2015). Un enrichissement d'ARN pol en pause est d'ailleurs observé, au cours de la transcription, au niveau des exons plus particulièrement alternatifs (Brodsky et al. 2005).

Selon le deuxième modèle, celui de recrutement, l'ARN pol II par son CTD pourrait servir de point d'ancrage, de plateforme, ce qui rapprocherait les facteurs d'épissage de leurs régions cibles sur le pré-ARNm naissant (Bentley 2005). Tel que mentionné un peu plus haut, de nombreux facteurs d'épissage s'associent avec l'ARN pol II (Das et al. 2007). Ce recrutement auprès de l'ARN pol II peut être indirect, au travers de l'association des

facteurs d'épissage avec des facteurs de transcription (Davies et al. 1998; Ge et al. 1998; Hallier et al. 1998). Plusieurs de ces facteurs de transcription tels que PGC-1 et TCERG1 ont d'ailleurs été démontrés comme ayant un rôle à jouer dans la régulation de certains événements d'épissage alternatif spécifiques, soulignant ainsi l'interconnectivité de ces deux processus (Monsalve et al. 2000; Montes et al. 2012; Montes et al. 2015). Le CTD étant propre à l'ARN pol II, son absence chez les autres polymérases d'ARN explique la faiblesse du processus d'épissage ou de la stabilité des pré-ARNm transcrits respectivement par les ARN pols III et I (Smale and Tjian 1985; Sisodia et al. 1987).

Au final, la nature même des promoteurs a une influence sur la régulation de l'épissage alternatif, ne serait-ce que par un recrutement différent de cofacteurs transcriptionnels ou facteurs d'épissage et un changement de l'identité de la polymérase impliquée. La fusion de gènes normalement transcrits par l'ARN pol II avec des promoteurs pour l'ARN pol III et l'ARN pol T7 résulte en une altération marquée de la régulation du processus d'épissage alternatif (Sisodia et al. 1987; McCracken et al. 1998). L'importance de l'identité des promoteurs dans la régulation de l'épissage alternatif est soutenue par le fait que l'utilisation d'hormones stéroïdiennes (progestérone, estrogène, dexaméthasone) n'influence le ratio des profils d'épissage des minigènes CD44 et calcitonine que dans un contexte où la transcription de ceux-ci est initiée par des promoteurs sensibles à ces hormones. Cette modulation des profils d'épissage découlerait du recrutement par les récepteurs nucléaires de corégulateurs, telles les protéines TLS et CoAA, ayant une dualité d'action au niveau de la transcription et de l'épissage (Auboeuf et al. 2002). Des essais d'échange de promoteurs contrôlant la transcription du gène de FN ont montré à nouveau une altération du profil d'épissage (le promoteur originel, ainsi que celui du cytomégalo virus accroît l'inclusion de l'exon cassette EDI, alors que celui de l' α -globine la réduit) due à une capacité différente selon le promoteur de recrutement de SRSF1 et SRSF7 au niveau d'un ESE et non pas à la force de celui-ci (Cramer et al. 1997; Cramer et al. 1999). Cependant, dans certains cas, la force des promoteurs pourrait avoir une influence déterminante dans la régulation de l'épissage alternatif. Dans une situation où un facteur d'épissage se trouve en quantité limitante telle qu'au niveau d'un répresseur d'identité inconnue lié à l'élément SB1 du pré-ARNm de *Bcl-x*, l'accroissement de la production de

transcrits au-delà d'un certain point sature rapidement la capacité de ce facteur donné, celui-ci n'étant pas en quantité suffisante pour réguler l'épissage alternatif de l'ensemble des transcrits naissants (Shkreta et al. 2011).

Au sein des cellules de mammifères, la vaste majorité (environ 80%) des réactions d'épissage alternatif ont lieu de façon cotranscriptionnelle. Le reste, post-transcriptionnel est concentré pour la plupart au niveau de l'extrémité 3' des pré-ARNm (Girard et al. 2012). Bien que l'association des composantes du spliceosome semble cotranscriptionnelle, l'excision des introns ne l'est pas obligatoirement. Cette coopération ou couplage est bidirectionnelle. À titre d'exemple, le facteur d'épissage SRSF2, recruté au niveau des promoteurs en tant que partie prenante du complexe 7SK, permet la dissociation du facteur de transcription P-TEFb de ce complexe répressif et la phosphorylation stimulatrice par celui-ci de la sérine 2 du domaine CTD de l'ARN pol II, surmontant ainsi les sites de pause initiaux et stimulant par conséquent l'élongation transcriptionnelle (Lin et al. 2008; Ji et al. 2013). Un avantage que l'on peut percevoir à ce couplage est un accroissement de l'efficacité de l'excision des introns ou exons alternatifs. En effet, la longueur des introns n'a aucune influence sur la vitesse d'excision qui reste similaire malgré un éventail de tailles fort différentes (Singh and Padgett 2009). Ainsi, l'association ou ancrage de l'exon en amont (5') à l'ARN pol II par le CTD permet le rapprochement rapide de celui-ci du site d'épissage 3' dès le moment qu'il émerge de la polymérase. Cela favorise ainsi la reconnaissance et l'assemblage du spliceosome dont les composantes du spliceosome, ainsi que les facteurs d'épissage se retrouvent concentrés dans l'environnement immédiat par leur association au CTD (Dye et al. 2006). Un autre avantage à ce couplage pour les cellules eucaryotes est une réponse rapide et concertée face à différents stress ou conditions de croissances. En effet, des analyses par micropuces à ARN d'expression globale des profils d'épissage suite à une altération de l'élongation transcriptionnelle ont montré un enrichissement parmi les unités positives d'ARNm codant pour des protéines liant l'ARN, particulièrement des facteurs d'épissage. Ces mêmes unités sensibles voient une accumulation intronique de l'ARN pol II en pause tout juste en amont des exons alternatifs cibles qui, pour la plupart, contient un PTC. Ainsi, le couplage transcription-épissage permettrait aux cellules, suite à un stress quelconque qui affecte l'efficacité

transcriptionnelle, de rapidement adapter les profils d'épissage par une modulation du niveau d'expression de facteurs impliqués dans la régulation de ce processus (Ip et al. 2011). D'ailleurs, l'induction de dommages à l'ADN par le rayonnement ultraviolet (UV) va, au travers d'une inhibition de l'élongation par une hyperphosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN pol II, altérer le profil d'épissage d'ARNm impliqués dans le devenir de la cellule, à savoir les gènes apoptotiques caspase 9 et *Bcl-x* (Munoz et al. 2009).

2.5. Influence de la chromatine

Les différentes modifications post-traductionnelles des queues des histones (acétylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitylation et sumoylation), ainsi que l'action des différents complexes de remodelage de la chromatine, contrôlent directement le compactage de la chromatine, faisant varier celle-ci d'un état d'ouverture (euchromatine) favorable à l'élongation transcriptionnelle à un état de fermeture inhibitrice (hétérochromatine) (Kouzarides 2007). Face à son importance dans l'initiation et la progression de la transcription et à la lumière du couplage transcription-épissage illustré précédemment, un rôle pour celle-ci fût rapidement envisagé dans la régulation du processus d'épissage alternatif.

Ainsi, en accord avec le modèle cinétique d'épissage cotranscriptionnel, les diverses marques d'histones, ainsi que les composantes des complexes de remodelage, peuvent influencer la sélection d'un exon alternatif au travers d'une régulation de la vitesse d'élongation de l'ARN pol II. Brahma (Brm), l'une des huit protéines constituant le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, favorise l'inclusion de l'exon alternatif v5 de CD44, de façon indépendante de son activité de remodelage. Brm, associée à l'ARN pol II, interagit avec la protéine Sam68 liée à l'exon v5, signalant ainsi la présence d'un exon alternatif et par conséquent induit un accroissement de la phosphorylation de la sérine 5 du domaine C-terminal de la polymérase. Cela se traduit par un arrêt de la progression de la présente polymérase et une accumulation des polymérases subséquentes, favorisant l'assemblage du spliceosome sur l'exon cible (Brm interagit avec U1 et U5 snRNPs) (Batsche et al. 2006). Au contraire, l'hyperacétylation locale de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9ac) induite par la dépolarisation des neurones hippocampaux ou

neuroblastomes (cellules N2a) ou par le traitement de ceux-ci avec l'inhibiteur de déacétylases d'histones TSA réduit l'inclusion de l'exon alternatif 18 de NCAM par un accroissement de la vitesse d'élongation de l'ARN pol II qui résulte de la production d'une chromatine plus ouverte (euchromatine) (Schor et al. 2009). L'altération des vitesses d'élongation transcriptionnelle qui découlerait d'une modulation différentielle des modifications post-traductionnelles des histones est un autre des mécanismes par lequel l'épissage alternatif peut être régulé différemment entre les tissus ou types cellulaires. En effet, dans les cellules hMCS où la marque H3K36me3 est présente, l'exon IIIb de FGFR2 est exclu de l'ARNm mature, alors que dans le cas des cellules épithéliales normales de la prostate (PNT2) où la modification post-traductionnelle est absente, IIIb est incorporé (Luco et al. 2010).

L'état de la chromatine participe aussi à la régulation des profils d'épissage en agissant sur le recrutement de facteurs d'épissage ou de composantes du spliceosome. La triple méthylation de la lysine 36 de l'histone 3 (H3K36me3), associée à une transcription active, prévient l'inclusion de l'exon alternatif IIIb de FGFR2 dans les cellules souches humaines mésenchymateuses (hMSC) par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice MRG15 recrutée. MRG15 à son tour va recruter la protéine hnRNP I/PTB qui ainsi réprime la sélection de cet exon qui contient, à l'instar d'autres unités régulées par ce complexe, des sites faibles de liaison pour PTB. Cette marque d'histone renforce donc l'action de PTB au niveau de ses cibles (Luco et al. 2010).

Le nucléosome joue un rôle important dans la distinction des exons pris dans l'immensité intronique. L'enrichissement de nucléosomes, autour desquels sont enrobés 147 paires de bases ou quasiment l'équivalent de la taille moyenne d'un exon chez l'humain, est nettement plus prononcé au niveau des exons que des introns, encore davantage si ceux-ci sont ceinturés de sites faibles d'épissage (Schwartz et al. 2009; Tilgner et al. 2009). Ces nucléosomes peuvent ainsi présenter un obstacle physique à la progression de l'ARN pol II, ce qui accroît l'inclusion des exons en accord avec le modèle cinétique de régulation cotranscriptionnelle (Churchman and Weissman 2011). L'absence de couverture nucléosomale chez les pseudoexons peut ainsi expliquer pourquoi ces séquences

introniques ceinturées de sites d'épissage forts ne sont pas incluses dans l'ARNm mature (Tilgner et al. 2009). Aussi, par des modifications post-traductionnelles spécifiques de la queue de leurs histones, les nucléosomes contribuent à la définition d'exon. À ce niveau, la triple méthylation de la lysine 36 de l'histone 3 (H3K36me3) et la monométhylation de la lysine 20 de l'histone 4 (H4K20me) sont enrichies au niveau des exons, constituant par le fait des marqueurs des exons. Ce marquage par H3K36me3 est d'ailleurs moins prononcé pour les exons alternatifs, permettant ainsi leur distinction des exons constitutifs (Schwartz et al. 2009).

À l'instar de la relation entre le processus d'épissage alternatif et la transcription, celle entre les modifications post-traductionnelles des histones et les facteurs d'épissage est bidirectionnelle. Les protéines Hu, suite à leur liaison cotranscriptionnelle au niveau de leurs régions cibles sur l'ARN, vont réduire l'activité de déacétylation d'HDAC2 (histone deacetylase 2) et entraîner une acétylation locale des histones au niveau des exons alternatifs qu'ils régulent. Le relâchement de la compaction chromatinienne engendre une augmentation de la vitesse d'élongation des prochaines polymérases d'ARN II qui transcriront à nouveau ces locus précis, ce qui a pour conséquence une exclusion accrue de ces exons (Zhou et al. 2011). Le recrutement cotranscriptionnel de SETD2, une méthyltransférase d'H3K36 (la lysine 36 de l'histone 3), et la triple méthylation subséquente au niveau des exons sont réduits par l'inhibition du processus d'épissage alternatif (de Almeida et al. 2011).

3. Gardien de la stabilité génomique

Outre une augmentation de l'efficacité et de la fidélité du processus d'épissage alternatif, un avantage de ce couplage transcription-épissage est la prévention d'une instabilité génomique causée par le pré-ARNm pouvant être délétère à l'homéostasie de la cellule. L'instabilité génomique peut avoir de graves conséquences sur l'homéostasie en altérant la régulation de l'épissage alternatif. L'instabilité génomique est définie comme toute modification à l'intégrité de la séquence nucléotidique du génome, allant des simples mutations ponctuelles à des réarrangements chromosomiques (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). La transcription est une source d'instabilité génomique. En effet, une

corrélation directe existe entre le niveau de transcription des gènes et le taux de mutation sur les deux brins d'ADN (transcrits et non transcrits) comme démontré chez la levure et dans les cellules germinales humaines (Park et al. 2012). Cet accroissement de la recombinaison génétique ou de la mutagenèse par la transcription constitue la TAR (*transcription-associated recombinaison*) et la TAM (*transcription-associated mutagenesis*) respectivement (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Kim 2008).

La réduction du niveau d'expression de SRSF1 dans des cellules de métazoaires (une lignée de lymphoblastes de poulet (DT40) et d'adénocarcinome humain du col de l'utérus (HeLa)) rend ces cellules hypermutagénique : (1) création de nouveaux phénotypes par réarrangement génomique (2) accroissement de dommages à l'ADN double brins (ex : phosphorylation de la sérine 139 de l'isoforme histonique γ -H2AX) (3) production augmentée de fragments d'ADN de haut poids moléculaire (Li and Manley 2005). La création de ce phénotype d'hypermutagénicité est empêchée par la surexpression de la protéine *SR-like* RNPS1, une protéine auxiliaire du complexe exon-jonction (EJC) (Li et al. 2007). La déplétion par ARNi de la protéine RNPS1 génère elle aussi la production de fragments d'ADN de haut poids moléculaire (Li et al. 2007). De même, la réduction des niveaux d'expression de SRSF2, à l'instar de SRSF1, augmente le niveau de phosphorylation de la sérine 139 d' γ -H2AX, entraînant par conséquent une activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) (Xiao et al. 2007). Cette fonction de protection de la part des facteurs d'épissage semble avoir été conservée au cours de l'évolution telle que montré par l'action de la protéine hnRNP Npl3 de *S. cerevisiae*, l'une des seules protéines de cet organisme pour lequel un rôle au niveau de la régulation de l'épissage alternatif a été démontré. À l'instar des autres facteurs présentés avant, son inactivation par knock-out (K-O) entraîne une TAR, en plus d'une sensibilité augmentée à des agents inducteurs de cassures double brins (MMS, hydroxyurée, phléomycine, UV) (Santos-Pereira et al. 2013).

Ce rôle de protecteur de l'intégrité génomique par des protéines liant l'ARN n'est pas uniquement l'apanage des facteurs d'épissage. Les nombreuses études des dernières années ont permis de souligner l'interconnectivité ou synergie entre le processus de transcription et

les divers processus qui régissent la maturation et le devenir d'un ARNm. Une analyse à grande échelle de la production de dommages à l'ADN perceptible par la phosphorylation d' γ -H2AX suite à la réduction par ARNi dans les cellules HeLa du niveau d'expression d'environ 21 000 gènes démontre un enrichissement significatif de gènes impliqués dans la maturation et l'exportation des ARNm. Parmi cette catégorie, on retrouve plusieurs composantes de la machinerie du spliceosome, ainsi que plusieurs membres des deux grandes familles de facteurs d'épissage tels que hnRNP C et K, SRSF1, 2, 3 et 8 (Paulsen et al. 2009). Chez la levure *S. cerevisiae*, une atteinte à l'intégrité du complexe THO-TREX, impliqué dans la régulation de la transcription et de l'exportation des ARNm du noyau, par l'inactivation par K-O de composantes protéiques (Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2, Sub2, Yra1) entraîne une altération de la vitesse d'élongation transcriptionnelle et surtout, un état d'hyperrecombinaison de l'ADN (Chavez and Aguilera 1997; Piruat and Aguilera 1998; Chavez et al. 2000; Fan et al. 2001; Jimeno et al. 2002; Huertas and Aguilera 2003). Ce phénotype d'instabilité génomique est reproduit par certains membres du complexe THO-TREX chez l'humain (hHpr1/THOC1, THOC5, UAP56 et ALY) et *C. elegans* (THOC-2), démontrant une conservation de cette fonction primordiale au travers de l'évolution (Dominguez-Sanchez et al. 2011; Castellano-Pozo et al. 2012). La surexpression du facteur d'épissage Npl3 peut annuler les effets de l'inactivation de composantes du complexe THO-TREX (Hpr1) (Santos-Pereira et al. 2013). Cette participation des gènes impliqués dans la biogénèse de l'ARNm dans la protection de l'intégrité génomique fut confirmé à nouveau chez la levure (l'inactivation par K-O induit un accroissement de l'intensité des foyers de Rad52), tout particulièrement pour les composantes du complexe de clivage et polyadénylation (CP), un rôle conservé pour ces protéines chez l'humain (FIP1L1) (Wahba et al. 2011; Stirling et al. 2012).

Ainsi, la réduction de la couverture appropriée du transcrit naissant d'ARN quittant l'ARN pol II par les RBPs accroît fortement le risque d'une réhybridation par certaines régions du pré-ARNm momentanément nues auprès de leurs séquences d'ADN complémentaires. Cette hybridation entraîne la formation d'une structure hybride composée d'un brin ARN et d'un brin ADN accompagnée d'un brin ADN simple-brin. Cette structure hybride d'ARN-ADN appelée R-loop pourrait être à la source de cette instabilité (Fig. 8) (Aguilera 2005).

Le phénotype d'hypermutableté causée par la déplétion de SRSF1 est aboli par la surexpression de la ribonucléase H1 (RNase H1) dont le substrat est le fragment d'ARN présent dans un duplex ARN-ADN (Li and Manley 2005). De même, chez la levure, l'état d'instabilité génomique causé par l'inactivation du complexe THO-TREX (y compris chez l'humain et *C. elegans*), du facteur d'épissage Npl3 ou des protéines impliquées dans la biogénèse de l'ARNm est éliminé par la surexpression de cette RNase (Huertas and Aguilera 2003; Dominguez-Sanchez et al. 2011; Wahba et al. 2011; Castellano-Pozo et al. 2012; Stirling et al. 2012; Santos-Pereira et al. 2013). Cette surexpression réduit fortement dans la plupart des cas la phosphorylation d' γ -H2AX induite par la déplétion par ARNi dans les cellules HeLa des gènes impliqués dans la maturation des ARNm (Paulsen et al. 2009). L'existence de ces structures hybrides dans un contexte de déplétion des RBPs a aussi été démontrée par des essais de modifications au bisulfite de sodium où les cytidines exposées sur le brin d'ADN non appariées sont désaminées en uridines. La déplétion de SRSF1 a accru la conversion de ces cytidines, conversion qui a été abolie par la surexpression de la RNase H1 (Li and Manley 2005).

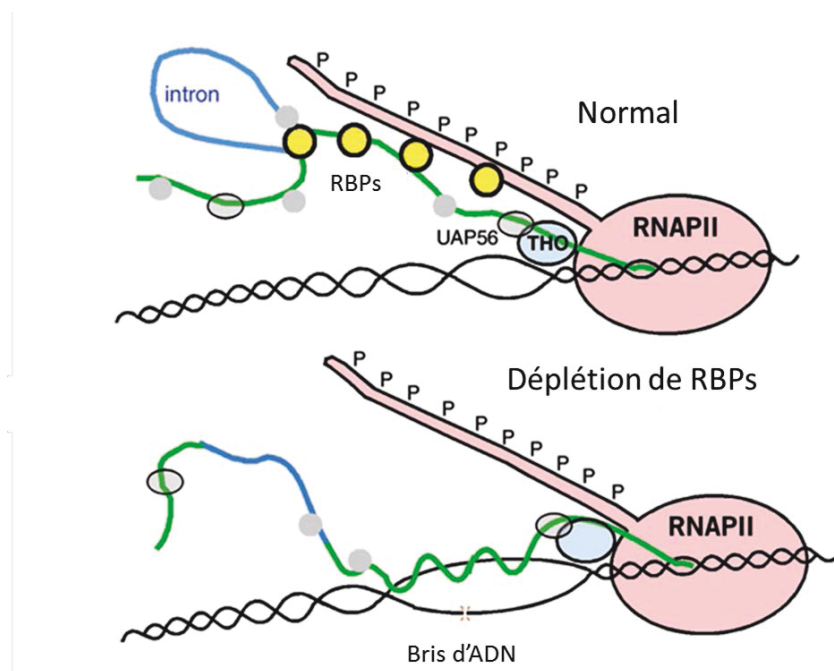


Figure 8: Instabilité génomique par la formation de R-loop. La couverture appropriée du pré-ARNm naissant par les RBPs empêche celui-ci de s'hybrider avec le brin d'ADN complémentaire, prévenant ainsi la formation de l'hybride d'ARN-ADN (R-loop) et les dommages d'ADN subséquents (Aguilera 2005).

Outre par la prévention de la formation de structure hybride ARN-ADN et dans la régulation de l'expression des divers effecteurs de la DDR via l'épissage alternatif, les facteurs d'épissage assurent la stabilité du génome par divers autres moyens indépendants de l'épissage. Comme mentionné précédemment, plusieurs facteurs d'épissage préviennent la dégradation des extrémités chromosomiques et la fusion des chromosomes en stimulant l'élongation des régions télomériques au travers du recrutement direct de la télomérase et de leur liaison à l'ARN non codant TERRA (LaBranche et al. 1998; Dallaire et al. 2000; Fiset and Chabot 2001; Zhang et al. 2006; Fu and Collins 2007; Lopez de Silanes et al. 2010; Takahama et al. 2013). Les facteurs d'épissage préviennent l'aneuploïdie par une ségrégation adéquate des chromosomes lors de la mitose en assurant entre autres le bon assemblage et maintien du fuseau mitotique (Ma et al. 2011; Hofmann et al. 2013). Les facteurs d'épissage peuvent participer aussi directement à la réparation de dommages à l'ADN en agissant principalement au niveau de la détection du dommage et des étapes initiales de la DDR ou en régulant l'activité de ses effecteurs. À titre d'exemple, la protéine *SR-like* FUS est rapidement recrutée au niveau de cassures doubles brins au travers d'interactions avec des chaînes de PAR (poly-ADP-ribose) ajoutées aux histones par la polymérase PAR et permet le recrutement subséquent de l'histone déacétylase 1 (HDAC1) essentielle à l'ouverture de la chromatine et à l'accessibilité des effecteurs de la DDR. La déplétion par ARNi de FUS réduit la réparation de ces lésions médiée par la recombinaison homologue, ainsi que par la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) (Mastrocola et al. 2013; Wang et al. 2013). En interagissant avec la glycosylase NEIL1, hnRNP U stimule l'activité de cette enzyme essentielle à l'élimination des bases nucléotidiques oxydées par la voie de réparation par excision de bases (BER en anglais) (Hegde et al. 2012).

3.1. R-loops

Les R-loops sont des structures hybrides ARN-ADN qui se forment lorsqu'un fragment d'ARN, que soit un pré-ARNm naissant, une amorce d'ARN ou un petit ARN non codant, s'apparie avec le brin d'ADN complémentaire suite au déplacement du brin d'ADN parental (non-transcrit). Dans cette présente thèse, nous allons nous concentrer sur les R-loops produites cotranscriptionnellement, donc à partir du transcrit naissant.

Bien qu'un hybride ARN-ADN se forme dans le centre actif de l'ARN pol II, il est peu probable que celui-ci soit à l'origine de la formation des R-loops étant donné que les brins d'ADN et d'ARN quittent le complexe transcriptionnel par des pores séparés (Westover et al. 2004; Roy et al. 2008). Le R-loop découlerait plutôt de l'hybridation subséquente du pré-ARNm émergent avec le brin d'ADN complémentaire momentanément non apparié dans la bulle présente dans le sillage d'une polymérase en action. L'existence de cette bulle ouverte est favorisée par le superenroulement négatif causé par la progression de la polymérase d'ARN II sur le brin d'ADN (Liu and Wang 1987). L'importance de ce superenroulement dans la formation des R-loops est soutenue par l'induction *in vivo* et *in vitro* de la formation de ces structures hybrides via l'action de l'ADN gyrase, une topoisomérase (type II) qui introduit du superenroulement négatif dans l'ADN (Gellert et al. 1976; Drolet et al. 1994; Masse et al. 1997; Phoenix et al. 1997; Nollmann et al. 2007). Ce superenroulement, par le maintien de la séparation des brins d'ADN, accroît la fenêtre d'opportunité propice à la formation de la structure hybride et réduit la dépendance de celle-ci à la présence de régions riches en guanosines au sein du pré-ARNm (Roy et al. 2010).

En effet, la composition locale nucléotidique des brins d'ADN et ARN est l'un des facteurs influençant la formation et stabilisation de la structure hybride. Les R-loops sont formés préférentiellement au niveau de régions riches en guanosines sur le transcrit d'ARN; les liens hydrogènes très forts entre une guanosine et une désoxycytidine résultent en la création d'hybrides ARN-ADN parfois plus stables que les duplex natifs d'ADN (Roberts and Crothers 1992; Sugimoto et al. 1995; Roy and Lieber 2009; Roy et al. 2010). Cette force d'appariement stabilisante explique la présence nécessaire de courtes répétitions (3 à 4 nt) de guanosines comme point d'ancrage (zone d'initiation) à la formation de l'embryon de R-loop qui sera par la suite agrandi grâce à la présence d'une région en aval (zone d'élongation) riche en guanosines (au minimum 40%) (Roy et al. 2008; Roy and Lieber 2009; Roy et al. 2010; Wongsurawat et al. 2012). Cette solide interaction assure par le fait même que le brin d'ARN associé ne sera pas déplacé subséquemment par le brin d'ADN non-transcrit. La présence primordiale de répétitions de guanosines laisse entrevoir un rôle de la part des G-quadruplex sur le brin non-transcrit dans la stabilisation de la structure

hybride. Cependant, malgré la présence de G-quadruplex sur le brin non-transcrit, le fait que l'utilisation de cations déstabilisants (lithium et césium) pour ces structures n'a pas eu d'impact sur la présence des R-loops rend la participation de ceux-ci dans la formation de la structure hybride peu probable (Duquette et al. 2004; Roy et al. 2008). À titre d'exemple de la pertinence de cet enrichissement, la région au sein de la β -actine où des R-loops ont été formées par la déplétion de SRSF1 était riche en guanosines dans le brin complémentaire d'ADN (Li and Manley 2005). De même, l'impact de la réduction du niveau d'expression des composantes du complexe THO-TREX sur la régulation de la transcription est plus marqué dans les transcrits riches en guanosines et cytidines (Chavez et al. 2001; Huertas and Aguilera 2003).

L'existence des R-loops découlant d'une compétition entre le brin d'ADN non-transcrit et le transcrit naissant, tout facteur favorisant l'appariement du pré-ARNm avec le brin d'ADN complémentaire au détriment du brin d'ADN non-transcrit favorise par conséquent la formation de la structure hybride. Outre le superenroulement négatif et la composition nucléotidique, la présence de nick (coupure simple brin dans un duplex d'ADN) sur le brin d'ADN non-transcrit privilégie l'hybridation du transcrit naissant. Cela résulte d'une réduction de la capacité du brin non-transcrit à former un duplex d'ADN suite à cette attaque sur son intégrité, entraînant le détachement de ce brin d'ADN en aval de la coupure. À l'instar du superenroulement négatif, la présence de nick réduit la nécessité d'avoir des régions riches en guanosines au sein du pré-ARNm pour la formation de la structure hybride. Cependant, la présence du nick, de même que pour la zone d'initiation du R-loop se doit d'être près du site d'initiation de la transcription. En effet, tout fardeau supplémentaire sous la forme de portions de transcrit non appariées en amont réduit la compétitivité du pré-ARNm vis-à-vis son homologue d'ADN (Roy et al. 2010).

3.1.1. Rôles bénéfiques des R-loops

Les hybrides ARN-ADN, tels que les R-loops, peuvent survenir naturellement *in vivo* et effectuer des fonctions bénéfiques pour la cellule si ceux-ci sont générés dans un contexte spatialement et temporellement contrôlé (Fig. 9).

Tout d'abord, la formation d'hybrides ARN-ADN est indispensable à la réplication du génome du bactériophage T4, du plasmide ColE1 d'*Escherichia coli* et du brin lourd (*heavy strand*) de l'ADN mitochondrial (Itoh and Tomizawa 1980; Xu and Clayton 1996; Kreuzer and Brister 2010) (Fig. 9A et 9B). Un transcrit naissant synthétisé au niveau des origines de réplication virales, plasmidiques ou mitochondriales s'y hybridera à ces régions et suite au clivage de la partie 3' par une RNase H qui produira une terminaison 3'-OH, celui-ci jouera le rôle d'amorce d'ARN nécessaire à l'initiation de la réplication. Non seulement le fragment d'ARN sert d'amorce, mais la structure hybride elle-même permet de garder la fourche de réplication ouverte et accessible à la machinerie du réplisome.

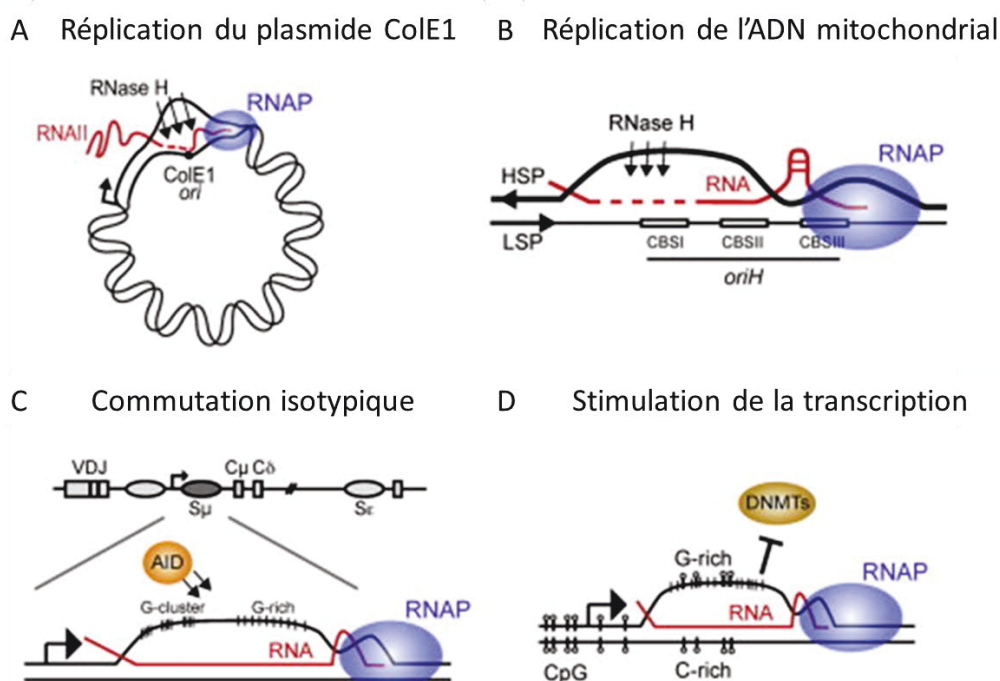


Figure 9: Rôles bénéfiques des R-loops. (A) Réplication du plasmide ColE1 (B) Réplication de l'ADN mitochondrial (C) Diversification de la production d'anticorps par commutation isotypique ou CSR ou changement de classe où les exons de la portion constante des IgM sont échangés pour ceux des IgG, IgA et IgE (D) Stimulation de la transcription au travers de la prévention de la méthylation des îlots CpG (Aguilera and Garcia-Muse 2012).

Le R-loop joue aussi un rôle critique dans l'initiation de la transcription (Fig. 9D). Pour la vaste majorité des locus dont l'expression est contrôlée par les îlots CpG, les environs du site d'initiation de la transcription (TSS) possèdent une asymétrie en guanosines-cytidines propice à la formation de R-loops (le brin d'ADN complémentaire est enrichi en cytidines). Ainsi, la formation de R-loops suite à la transcription de ces régions empêche la

méthylation des dinucléotides CpG, une modification épigénétique liée à la répression de la transcription par la méthyltransférase DNMT3B1 (Ginno et al. 2012).

Au niveau de la transcription, la formation de R-loops est aussi essentielle à la terminaison de la transcription effectuée par l'ARN pol II. En effet, la prévention par la surexpression de la RNase H1 de la formation de la structure hybride au niveau de sites de pause riches en guanosines situés en aval du signal de polyadénylation entraîne la progression excessive de la polymérase (*readthrough*). Autant la formation de la structure hybride que sa dissolution éventuelle par l'hélicase senataxin (assurant ainsi l'accessibilité du site de clivage polyA à l'exonucléase Xrn2) sont essentielles à la terminaison de la transcription (Skourti-Stathaki et al. 2011).

Finalement, la structure hybride qu'est le R-loop permet la production d'anticorps de haute affinité par les lymphocytes B (Fig. 9C). Les lymphocytes B peuvent produire une variété d'anticorps qui excède grandement la quantité totale de gènes contenus dans le génome humain. Cette adaptation et évolution rapide de leur réservoir d'anticorps va nécessiter, suite à la recombinaison V(D)J (qui produit le réservoir primaire d'anticorps de faible affinité), l'emploi de processus de diversification génétique somatique au niveau du locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline. Ces processus qui dépendent de l'instabilité génomique, soit l'hypermutation somatique (SHM) où plusieurs substitutions uniques de nucléotides surviennent aux environs de la région variable réarrangée de l'immunoglobuline, la conversion de gène (utilisation d'un pseudogène V) ou la commutation isotypique (CSR) où les exons de la portion constante des IgM sont échangés pour ceux des IgG, IgA et IgE, sont initiées par le même événement, soit une déamination d'une désoxycytidine (Neuberger et al. 2003; Di Noia and Neuberger 2007). Cette réaction, qui convertit une désoxycytidine en désoxyuridine, est catalysée par la protéine AID (*activation induced (cytidine) deaminase*), une déaminase exprimée normalement uniquement dans les cellules folliculaires B activées du centre germinale et qui possède une forte homologie avec APOBEC1, membre d'une famille d'éditases d'ARN (Muramatsu et al. 1999; Muramatsu et al. 2000; Petersen-Mahrt et al. 2002). AID catalyse la déamination de désoxycytidines présentes au sein d'un ADN simple brin et préférentiellement contenues

dans le motif WRC (W : adénosine ou thymidines, R : purines), (Bransteitter et al. 2003; Pham et al. 2003). Ce simple brin d'ADN est fourni par la formation de la structure hybride (Yu et al. 2005). En effet, les SHM et CSR nécessitent toutes deux une transcription active (Xu et al. 1993; Maizels 1995), l'enzyme AID déamine avec une plus grande efficacité les désoxycytidines présentes sur le brin d'ADN non transcrit (Pham et al. 2003) et finalement, la formation de R-loops au niveau des régions S répétées riches en guanosines-cytidines en amont des exons de la portion constante est indispensable à la CSR (Yu et al. 2003). Le recrutement d'AID au niveau de l'ADN est vraisemblablement facilité par son association avec RPA, une protéine qui recouvre et stabilise l'ADN simple brin (Chaudhuri et al. 2004). Cette formation d'une lésion dU:dG produite par la déaminase va amener l'activation de voie de réparation par excision de bases et l'utilisation de l'uracile-ADN glycosylase et de l'endonucléase abasique, ouvrant la porte à la formation de nicks (et ultimement de dommages doubles brins propices à la recombinaison) ou de sites abasiques (qui pourront entraîner l'incorporation de mutations par la réplication translésionnelle (Neuberger et al. 2003; Di Noia and Neuberger 2007).

3.1.2. Conséquences négatives de la formation de R-loops

L'intégrité génomique est la plus menacée lors de la réplication en phase S où le réplisome se doit de surmonter divers obstacles qui pourraient entraîner son blocage (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). L'instabilité génomique induite par les R-loops impliquerait une altération de la progression de la réplication et un désassemblage subséquent de la fourche répllicative. En effet, l'induction de la formation de R-loops par la déplétion du facteur d'épissage SRSF1 dans les cellules HeLa entraîne une production accrue de fourches répliquatives dont la progression est bloquée. De plus, l'apparition de dommages à l'ADN (γ -H2AX) induite par la déplétion de SRSF1 nécessite une réplication active dans les cellules HeLa (Gan et al. 2011). Cette implication de la réplication dans l'hyperrecombinaison est aussi observée chez *E. coli*, soulignant l'importance conservée au travers de l'évolution du processus réplcatif dans l'induction d'instabilité génomique par le R-loop (Gan et al. 2011). Chez la levure, la déplétion d'une composante du complexe THO/TREX (Hpr1), mutant mentionné précédemment comme induisant une altération de la vitesse d'élongation transcriptionnelle, cause un blocage de la progression des fourches

réplicatives. La TAR causée par la déplétion d'Hpr1 est observée lorsque la transcription est sous le contrôle d'un promoteur actif en phase S (Wellinger et al. 2006). Finalement, une rencontre frontale entre la machinerie transcriptionnelle et une fourche répllicative entraîne un arrêt de la progression de cette dernière et un accroissement de la TAR, phénomène absent si les deux processus sont codirectionnels (Prado and Aguilera 2005). Le risque à l'intégrité génomique posé par la collision entre les machineries transcriptionnelles et réplicales peut expliquer le fort penchant dans une optique de réduction des collisions frontales néfastes en faveur d'une codirectionalité de ces deux processus chez l'humain (Huvet et al. 2007).

Ainsi, le blocage de la progression des fourches réplicales et le désassemblage subséquent de celles-ci par la formation de la structure hybride peut venir de la présence obstructive du R-loop lui-même (Fig. 10B) ou d'une ARN pol II arrêtée par son attachement à la structure hybride qui agit telle une ancre (Fig. 10C). L'accumulation de superenroulement positif en amont de la structure hybride peut aussi entraîner un renversement de la progression d'une fourche répllicative, résultant en une jonction d'Holliday hautement récombinogène (Fig. 10D). Finalement, le simple brin d'ADN présent dans la structure hybride, lui-même fort instable, peut contenir des cassures qui entraînent un désassemblage de la fourche lorsque celle-ci rencontre cet obstacle (Fig. 10A) (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Aguilera and Garcia-Muse 2012; Skourti-Stathaki and Proudfoot 2014). Le blocage de la progression de la fourche de réplication et de l'élongation transcriptionnelle par la structure hybride pourrait être causé par un accroissement de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10), une modification post-traductionnelle des histones qui engendre une chromatine plus compacte (Castellano-Pozo et al. 2013). La création de cassures double brins des suites du désassemblage de la fourche répllicative peut résulter en la formation de mutations par l'emploi de processus de réparation hautement mutagéniques visant à résoudre cette situation (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Aguilera and Garcia-Muse 2012; Skourti-Stathaki and Proudfoot 2014).

L'instabilité génomique peut aussi venir de la structure hybride elle-même. La formation du R-loop expose le brin non-transcrit d'ADN, maintenant sous conformation simple brin, à

des attaques sur son intégrité génomique. Cette conformation simple brin de l'ADN est nettement plus instable que celle du duplex d'ADN, et prompt à la déamination spontanée des cytosines non appariées en uraciles (Frederico et al. 1990; Lindahl 1993). Cette déamination spontanée comporte un fort penchant en faveur du brin non-transcrit exposé,

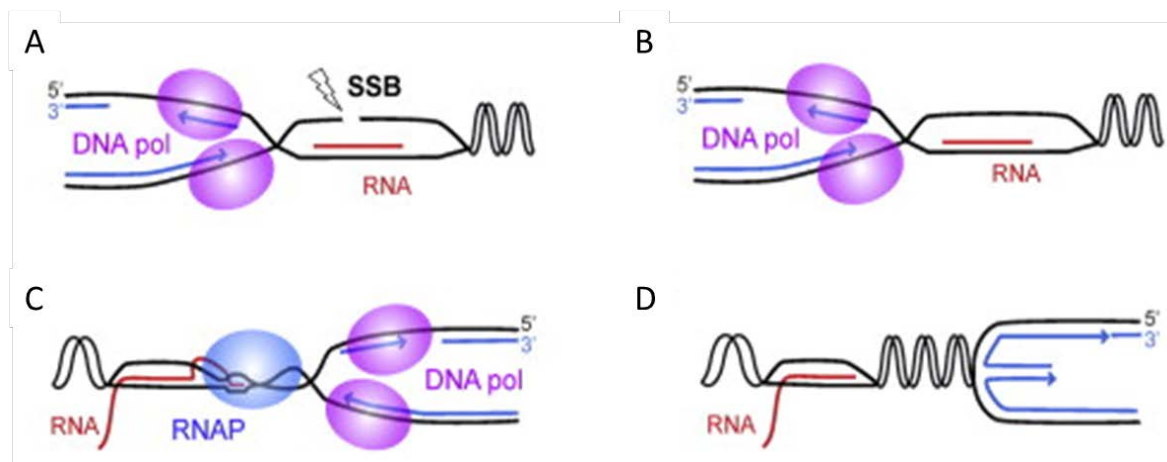


Figure 10: R-loops comme source d'instabilité génomique. Les fourches répliquatives peuvent être bloquées et désassemblées si elles (A) rencontrent une lésion d'ADN non réparée sur le simple brin d'ADN déplacé (B) entrent en collision avec l'hybride d'ARN-ADN lui-même (C) ou avec une ARN polymérase II coincée par le R-loop au site de transcription (D) L'accumulation de superenroulement par la structure hybride peut entraîner le renversement de la fourche répliquative (Aguilera and Garcia-Muse 2012).

celui-là même qui est exposé par la formation de la structure hybride (Skandalis et al. 1994). La TAM elle aussi montre un penchant pour le brin non-transcrit, asymétrie qui est dépendante du niveau de transcription des gènes cibles (Green et al. 2003; Majewski 2003). Cette exposition du brin non-transcrit d'ADN permet entre autres à l'enzyme AID d'induire un accroissement de la diversité et de l'affinité des anticorps, mais aussi ouvre la porte à une mutagenèse critique pour la transformation des cellules. La formation du R-loop au niveau des régions S de la chaîne lourde des immunoglobulines et de l'oncogène c-myc permet par la génération de cassures d'ADN double brins la translocation de myc au niveau du promoteur fort des immunoglobulines via l'action de l'enzyme surexprimée AID, étape essentielle à l'émergence du lymphome de Burkitt (Ruiz et al. 2011; Robbiani and Nussenzweig 2013). D'autres membres de la famille d'éditases APOBEC (APOBEC1, APOBEC3C et APOBEC3G) ont été démontrés, à l'instar d'AID, comme ayant la capacité de catalyser la déamination de cytidines *in vivo* et contrairement à AID, ont un patron d'expression tissulaire plus étendu (Harris et al. 2002). Ces enzymes pourraient donc

participer à l'instabilité génomique provenant de la création de R-loops. APOBEC3B est surexprimée dans plusieurs tissus cancéreux humains et directement responsable de l'émergence de mutations qui ont pu contribuer au développement de ces cancers (Burns et al. 2013; Burns et al. 2013; Leonard et al. 2013). Aussi, les G-quadruplexes présents sur le simple brin d'ADN peuvent être reconnus et coupés par certaines nucléases spécialisées telles que GQN1 (Sun et al. 2001).

3.1.3. Prévention de la formation des R-loops

Le danger posé par les R-loops a amené les organismes à développer des mécanismes de défense ou prévention. Chez les métazoaires où l'épissage est omniprésent, ce rôle de gardien de la stabilité du génome a pu facilement être délégué au courant de l'évolution aux facteurs d'épissage. Bien que ceux-ci lient des séquences d'ARN spécifiques avec une haute affinité dans l'exercice de leur rôle de régulateur de l'épissage alternatif, la régulation de l'épissage constitutif par les facteurs d'épissage, surtout dans le cas des protéines SR, souligne leur capacité à lier des régions de faible affinité. Ils peuvent donc couvrir le transcrit naissant de manière non spécifique et avec une certaine redondance fonctionnelle, constituant ainsi des candidats idéaux à ce rôle de protecteur. L'utilité de cette redondance fonctionnelle pour cette fonction de protection a été illustrée par l'abrogation de la formation de R-loops causée par la déplétion de SRSF1 par la surexpression de RNPS1 (Li et al. 2007). Chez les eucaryotes inférieurs où l'épissage est peu présent, et par extension les facteurs d'épissage tels que les protéines SR, ce rôle pourrait avoir été dévolu aux protéines impliquées dans la régulation de la transcription et de l'exportation des transcrits matures comme celles du complexe THO-TREX.

Chez les procaryotes, le couplage transcription-traduction, possible par l'absence de compartimentation cellulaire, a permis de réduire le risque de production des structures hybrides néfastes. L'inhibition de la traduction par l'élimination d'un codon d'initiation, de la séquence Shine-Dalgarno (site de fixation du ribosome) ou par l'emploi d'inhibiteurs (spectinomycine, chloramphénicol ou kanamycine) lorsque la topoisomérase I est inactivée entraîne la formation de R-loops et de superenroulement négatif (Masse and Drolet 1999; Drolet et al. 2003). Les ribosomes, par leur chargement rapide sur les transcrits émergents

et leur déplacement sur ceux-ci, préviennent l'hybridation des transcrits naissants auprès du brin d'ADN complémentaire, en plus de défaire toutes structures hybrides qui auraient pu être générées (Drolet et al. 2003). Hormis au travers d'un couplage traduction-transcription, les procaryotes peuvent prévenir la formation de la structure hybride par l'entremise des protéines Rho impliqués dans la terminaison prématurée de la transcription de transcrits non-traduits (Broccoli et al. 2004).

Par son importance dans la création des R-loops, toute enzyme qui réduit le superenroulement négatif au sein de l'ADN a le potentiel de réduire le risque de la formation de la structure hybride. L'inactivation par mutation de *topA*, une topoisomérase (type I) d'*E. coli* qui réduit le superenroulement négatif formé dans le sillage d'une ARN pol en progression, induit la formation de R-loops *in vitro* et *in vivo* lors de la transcription bactérienne (Drolet et al. 1994; Masse et al. 1997; Phoenix et al. 1997). Outre par la suppression du superenroulement, la topoisomérase I peut empêcher la formation de la structure hybride en favorisant le recrutement de diverses RBPs, telle que SRSF1 avec laquelle elle interagit directement, et la liaison de celles-ci au transcrit d'ARN naissant (Tuduri et al. 2009).

Pour prévenir la formation de la structure hybride, les multiples organismes disposent de diverses hélicases ARN-ADN dont sentaxin (Kim et al. 1999). Chez *S. cerevisiae*, la déplétion de Sen1 s'accompagne de TAR, de la production augmentée de dommages à l'ADN (foyers de Rad52) et surtout de la formation accrue de R-loops. La perte de Sen1 est compensée par la surexpression de la RNase H, soulignant le rôle préventif de sentaxin dans la formation de la structure hybride. Finalement, à l'instar de la RNase H, la surexpression de l'hélicase abolit le phénotype d'hyperrecombinaison généré par la perte d'un membre du complexe THO/TREX (*mft1*) (Mischo et al. 2011). D'autres hélicases ARN-ADN telles que PIF1 chez la levure et DHX9 chez l'humain sont aussi possiblement impliquées dans la prévention de la formation de la structure hybride (Boule and Zakian 2007; Chakraborty and Grosse 2011). Ces deux dernières hélicases peuvent aussi défaire les probables G-quadruplexes formés sur le brin d'ADN exposé (Ribeyre et al. 2009; Sanders 2010; Chakraborty and Grosse 2011).

Finalement, tel que mentionné précédemment, la structure hybride ARN-ADN est le substrat d'une classe de ribonucléases conservées entre les procaryotes et les eucaryotes, à savoir les RNAses H, essentielles à la réplication mitochondriale et bactérienne. Deux principaux types de RNase H (H1 et H2) existent et ont un substrat et un patron de coupure qui leur sont propres. La RNase H1 (monomérique) nécessite un substrat comprenant au moins quatre ribonucléotides consécutifs. Ainsi, la RNase H1 ne peut servir à l'élimination des ribonucléotides insérés par inadvertance (incorporés de façon individuelle) dans les brins d'ADN lors de la réplication, au contraire de la RNase H2 (un hétérotrimère chez les eucaryotes) (Cerritelli and Crouch 2009).

3.2. Évolution

L'instabilité génomique peut aussi être vue positivement comme un catalyseur de l'évolution par la création de nouveaux introns ou exons alternatifs ou par l'altération de la régulation des événements d'épissage. Il fut rapidement envisagé après la découverte de l'existence de l'épissage et de l'interruption du continuum des séquences codantes comment une simple mutation ponctuelle ou polymorphisme nucléotidique (SNP), qui auparavant était perçue comme n'affectant que l'identité d'un simple acide aminé, a le potentiel de générer de nouvelles protéines par l'ajout ou l'élimination de régions entières d'acides aminés si elle survient à un endroit critique pour la régulation du processus d'épissage (Gilbert 1978). L'évolution de l'épissage alternatif est ponctuée par des phases de gains et de pertes d'exons ou d'introns. L'altération de l'intégrité génomique peut entraîner la création de nouveaux exons alternatifs à partir de séquences codantes déjà présentes via le <<shuffling>> d'exons (déplacement / remaniement) ou la conversion d'exons constitutifs en exons alternatifs (Keren et al. 2010).

Le <<shuffling>> d'exons consiste en la duplication, souvent en tandem (exons consécutifs), d'un ou plusieurs exons au sein de leur gène d'origine ou en l'insertion d'un ou plusieurs exons issus d'un autre locus. À titre d'exemple, au moins 10% des événements d'épissage alternatif de substitution (situation où une seule des deux séquences d'acides aminés en compétition sera incluse dans la protéine finale) chez l'humain ont émergé de la

duplication d'exons adjacents, nombre qui est très certainement sous-estimé par la dégénérescence de la séquence nucléotidique causée par un relâchement de la pression sélective dû à la redondance (Kondrashov and Koonin 2001). Une autre étude montre qu'environ 10% des gènes humains contiendraient une duplication d'exons en tandem et de ceux-ci, au moins 60% seraient impliqués dans des situations d'épissage alternatif mutuellement exclusifs (Letunic et al. 2002). Finalement, il est estimé qu'au moins 20% des exons contenus chez les eucaryotes ont été générés à partir du processus de <<shuffling>>, (Long et al. 1995). Plus d'un incident de duplication ciblant le même exon peut survenir, comme cela semble avoir été le cas au niveau de l'exon 6 du gène de la troponine I de la drosophile où 4 exons mutuellement exclusifs (6a1, 6a2, 6b1 et 6b2) ont une séquence très similaire, suggérant l'existence d'une origine commune (Barbas et al. 1993).

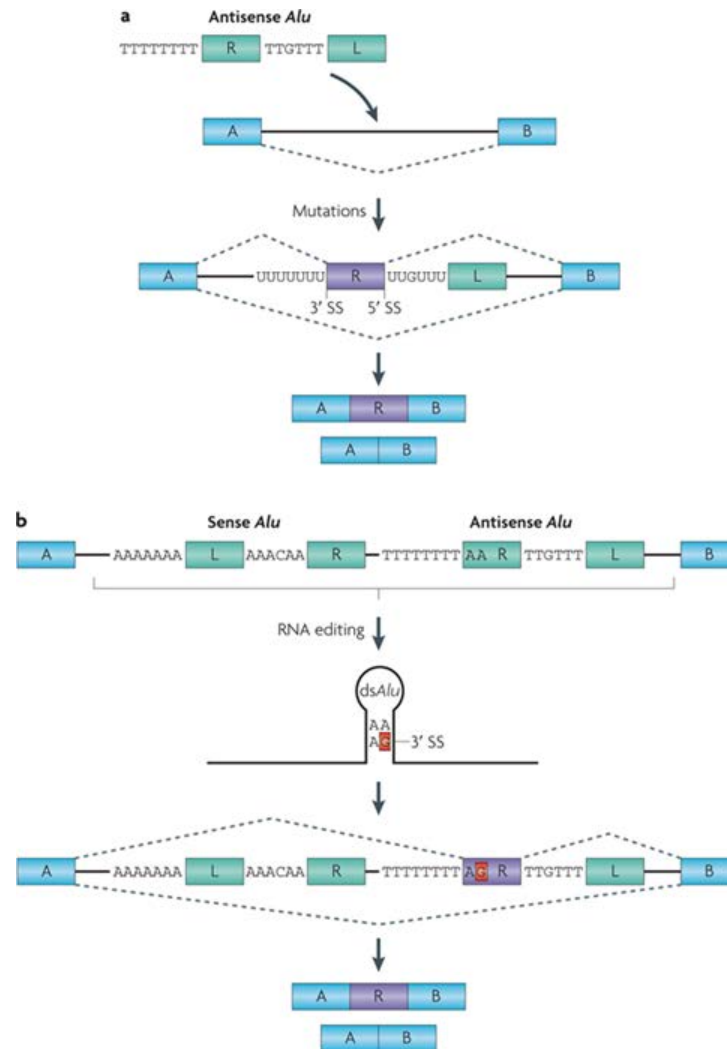
Ce phénomène de <<shuffling>> peut découler d'une recombinaison intronique illégitime (non homologue) entre de courtes séquences homologues, telles que les éléments Alu répétés, ou carrément non homologues (van Rijk and Bloemendal 2003). Le <<shuffling>> d'exons peut aussi être médié au travers de l'emploi de rétrotransposons, tels que les éléments LINE-1 ou L1, qui ne nécessitent pas d'homologie de séquence (Eickbush 1999; Moran et al. 1999). L'hypothèse que la création de nouvelles protéines par une combinaison originale de domaines protéiques découlant du <<shuffling>> d'exons suppose l'existence d'une concordance entre ceux-ci. La découverte de la correspondance entre les limites des exons et les modules protéiques chez neuf vertébrés et invertébrés, corrélation qui s'accroît avec la complexité des organismes, est venue non seulement soutenir l'existence du <<shuffling>>, mais son importance dans l'évolution et l'apparition de protéines à multiples domaines chez les eucaryotes multicellulaires (Liu and Grigoriev 2004).

Un deuxième moyen par lequel de nouveaux exons alternatifs peuvent être générés à partir de séquences codantes existantes est par la transformation d'exons constitutifs en exons alternatifs. Cela émerge d'un relâchement des contraintes (pression négative) sur la conservation de l'intégrité des sites d'épissage, principalement au niveau du site d'épissage

5'. Cet affaiblissement de la reconnaissance du site 5' par U1 snRNA s'accompagne au fil du temps de la création de séquences régulatrices à proximité. Ces nouveaux exons alternatifs, pour la majorité spécifique à l'espèce de l'hôte, conservent les caractéristiques d'exons constitutifs, reflet de leur origine, tels que le haut niveau d'inclusion et la faible conservation des régions introniques avoisinantes (faiblement enrichie en régions régulatrices). Ces nouveaux exons, au travers des générations, verront leur caractère alternatif se raffiner par l'acquisition de caractéristiques propres à cette classe d'exons ou, au contraire, pourraient redevenir des exons constitutifs (Lev-Maor et al. 2007).

L'apparition de nouveaux exons peut aussi résulter d'une création de novo à partir des régions non codantes du génome par le processus d'exonisation. Ces nouveaux exons seraient créés à partir des séquences hautement répétées qui parsèment notre génome et dont la plus sollicitée dans le processus d'exonisation serait les éléments Alu. Les éléments Alu sont des rétrotransposons dimériques (deux monomères ou bras monomères séparés par une courte séquence riche en adénosines), membres de la famille des éléments intercalés courts (SINE ou *short interspersed element*), qui composent près de 10 % de notre génome (Lander et al. 2001). Ces éléments, typiquement d'une longueur proche de 300 nt, possèdent une queue poly-A de 18 nt en aval. Les éléments Alu sont uniquement présents au sein des génomes de primates, indice de leur possible implication dans l'évolution de ces espèces, et majoritairement insérés dans une orientation anti-sens (85%). Dans cette configuration, la queue poly A, maintenant en amont sur le brin d'ADN non-transcrit, constitue un PPT qui est suivi dans chacun des monomères de pseudo-sites (situés aux positions 275 et 158 respectivement dans le monomère proximal) à la séquence nucléotidique très similaire à des sites d'épissage 3' et 5' authentiques. Ainsi, la conversion de ces pseudo-sites silencieux en site d'épissage fonctionnel ne dépend que de quelques substitutions nucléotidiques, pour la plupart survenant dans le monomère le plus amont (proche du PPT) dans la configuration anti-sens (Fig. 11A) (Sorek et al. 2002; Lev-Maor et al. 2003; Sorek et al. 2004; Keren et al. 2010). Cette création d'un nouveau site d'épissage 3' à partir de séquence répétées Alu peut aussi nécessiter l'intervention du processus d'édition d'ARN. En effet, la présence contiguë de séquences Alu en orientation inversée l'une par rapport à l'autre peut entraîner la formation d'une tige boucle cible de la famille

d'éditases d'ARN ADAR. La conversion d'une adénosine en inosine, puis la reconnaissance subséquente de celle-ci comme guanosine, résulte en la formation d'un site d'épissage 3' fonctionnel (Fig. 11B) (Keren et al. 2010).



Nature Reviews | Genetics

Figure 11: Exonisation des éléments Alu. (A) Lorsqu'inséré dans une orientation antisens, la queue poly A de l'élément Alu devient un PPT qui est suivi de deux pseudo-sites. La conversion de ces pseudo-sites silencieux en site d'épissage fonctionnel ne dépend que de quelques substitutions nucléotidiques (B) La présence contiguë de séquences Alu en orientation inversée l'une par rapport à l'autre peut entraîner la formation d'une tige boucle qui sera reconnue par des éditases d'ARN. La conversion d'une adénosine en inosine, puis la reconnaissance subséquente de celle-ci comme guanosine, résulte en la formation d'un site d'épissage 3' fonctionnel (Keren et al. 2010).

Un peu plus de 5% des exons alternatifs du génome humain seraient issus d'une exonisation d'éléments Alu (Sorek et al. 2002). Approximativement 4% des gènes humains

contiennent au sein de leurs régions codantes des éléments transposables, la vaste majorité issus de régions introniques qui ont été convertis en nouveaux exons (Nekrutenko and Li 2001). Ainsi, les régions répétées, qui constituent près de la moitié de notre génome (46 %), auparavant perçues comme de l'ADN <<junk>> joueraient donc un rôle important dans l'évolution des organismes (Lander et al. 2001). La vaste majorité des nouveaux exons cassettes, le principal type d'événement d'épissage alternatif chez les exons nouvellement créés chez les humains, origine de la conversion de régions hautement répétées, le <<shuffling>> d'exons n'ayant qu'une contribution mineure dans l'établissement de nouveaux exons chez l'humain. La plupart de ces nouveaux exons sont générés au niveau des régions non traduites dont principalement le 5' UTR, adoucissant ainsi l'ajout d'une région codante en conservant l'intégrité de la protéine. Une autre façon d'atténuer l'ajout est au travers d'une efficacité d'inclusion faible, conservant ainsi l'isoforme majoritaire fonctionnelle et permettant à la nouvelle isoforme mineure d'évoluer et d'acquérir une nouvelle fonction bénéfique (exaptation) qui assura sa conservation (Zhang and Chasin 2006).

Au niveau de l'origine des régions introniques, celles-ci (ainsi que la machinerie du spliceosome) peuvent avoir évoluées à partir des introns auto-catalytiques de type II présents dans les chromosomes et plasmides d'eubactéries, ainsi que dans les organelles de protistes, fungi et plantes. Cette hypothèse est basée sur les similarités structurales et fonctionnelles entre ces introns et ceux spliceosomaux au niveau du processus d'épissage. Comme certains de ces introns de type II codant pour une transcriptase inverse, ceux-ci peuvent avoir été disséminés horizontalement au sein du génome par plusieurs phases de rétrotransposition. Graduellement, ces introns devront perdre leur capacité auto-catalytique, possiblement par l'accumulation de mutations causée par un relâchement de la pression sélection des suites de l'apparition de mécanismes d'excision trans, pour devenir d'authentiques introns spliceosomaux (Lynch and Richardson 2002). Un autre moyen par lequel les introns peuvent être générés serait par duplication génomique. Prenons le cas d'une région comprenant le tétranucléotide AGGT. Cette séquence contient les dinucléotides AG et GT qui correspondent exactement aux dinucléotides conservés des sites d'épissage 3' et 5' respectivement des introns U2 GT-AG. Ainsi, la duplication de la

région contenant ce tétranucléotide fournirait deux potentiels sites d'épissage et donc entraînerait la création d'un intron à partir de la séquence ceinturée par ces sites. La même situation prévaut pour les tétranucléotides AGGC (introns GC-AG) et ACAT (introns U12 AT-AC). La forte homologie nucléotidique des régions chevauchant les extrémités d'un intron chez l'humain et la faible conservation de celles-ci vis-à-vis les autres espèces (souris, chimpanzé) souligne la création récente et continue de ces introns propres à l'humain. Les introns avec la plus forte homologie sont tous localisés au sein de régions répétées en tandem ou VNTRs (*variable-number tandem repeats*). Les VNTRs sont des motifs répétés d'une longueur de 6 à 100 nt et pouvant être étalés sur 0,5 à plusieurs kbp (Vergnaud and Denoeud 2000). Ce sont les régions les plus instables du génome qui en raison de leur nature répétée sont souvent contractées ou étendues par glissement de la polymérase d'ADN, ou altérés par recombinaison mitotique ou par conversion génique méiotique lors de chaque réplication/duplication cellulaire (Jeffreys et al. 1988; Jeffreys et al. 1997; Jeffreys and Neumann 1997; Bois and Jeffreys 1999; Jeffreys et al. 1999; Vergnaud and Denoeud 2000). Cette instabilité chez les VNTRs est présente au sein des cellules somatiques, mais à un degré moindre que dans les gamètes (Jeffreys and Neumann 1997). Ainsi, la duplication génomique joue un rôle non négligeable dans l'acquisition de nouveaux introns et encore une fois, les régions répétées du génome constituent un terreau fertile à l'évolution et à l'individualisation des profils d'épissage alternatif au sein des populations humaines (Zhuo et al. 2007).

3.3. Différence interindividuelle de la régulation de l'épissage alternatif

Des analyses de micropuces à ADN ont montré que la séquence nucléotidique du génome humain diverge entre les individus d'environ 1,5%, une vaste majorité de cette divergence étant due à une variation du nombre de copie des VNTRs (Pang et al. 2010). Cette divergence, possiblement sous-estimée par rapport à la réalité, peut sembler petite et peu importante considérant le fait que les régions intergéniques constituent la majorité du génome, mais celle-ci ouvre tout de même la porte à un impact sur la régulation de l'épissage alternatif de certains événements. En effet, les études de séquençage à haut débit du transcriptome ont révélé que le profil d'épissage d'un certain nombre d'événements varie d'un individu à l'autre de 10 à 30 %, suggérant l'importance de la variabilité

nucléotidique dans la régulation des événements d'épissage alternatif (Wang et al. 2008). La majorité des variations nucléotidiques simples (SNVs) présentes dans les régions codantes ayant émergé dans les cinq à dix milles dernières années, le génome humain continue donc d'évoluer et a ainsi le potentiel d'altérer le profil de nombreux événements d'épissage (Fu et al. 2013).

L'emploi des lignées de lymphoblastoïdes (LCL) du projet HapMap (2005), banque de données cataloguant plus d'un million de SNPs, a permis d'établir de premières associations entre patrons d'épissage et variations génétiques au sein des populations humaines (Coulombe-Huntington et al. 2009; Kwan et al. 2009; Zhang et al. 2009; Pickrell et al. 2010; Lalonde et al. 2011). À titre d'exemple, auprès de 70 exons cassettes alternatifs, six d'entre eux voient une variation significative au niveau de leur profil d'épissage entre différentes lignées de lymphoblastoïdes issues de 22 individus, variation qui corrèle fortement avec la présence de SNP aux environs des sites d'épissage (Hull et al. 2007). Dans une autre étude employant à nouveau des lignées de lymphoblastoïdes, neuf exons cassettes ont un profil d'épissage différent entre deux individus, avec trois de ceux-ci ayant un renversement drastique de l'identité de l'isoforme majeure. Parmi ces neuf exons, le changement de ratio d'épissage de trois d'entre eux corrèle avec la présence de SNP (Kwan et al. 2007). Finalement, auprès de 324 gènes dont la variation d'expression est reliée à la présence de SNPs, 85 d'entre eux (soit 26%) voient une altération du ratio des isoformes produites par l'épissage alternatif (Kwan et al. 2008).

Ainsi, cette variabilité interindividuelle dans le profil d'événements d'épissage alternatif dû à l'instabilité génomique pourrait être en partie la cause de la diversification phénotypique présente au sein des populations humaines (Lee et al. 2012). Par exemple, cette différence au niveau de la régulation de l'épissage alternatif par la présence de SNP peut expliquer la variabilité individuelle dans la réponse immunitaire et face aux traitements. La présence d'un SNP (A > G) au niveau du site d'épissage 5' de l'exon 10 d'ERAP2, une protéine impliquée dans la préparation de l'antigène présenté par le CHM (complexe d'histocompatibilité majeur) de classe I, entraîne l'utilisation préférentielle d'un site d'épissage 5' cryptique située dans l'intron en aval. L'utilisation du site cryptique mène à

l'incorporation de 56 nt comprenant deux PTCs assujettis au processus de NMD. Ainsi, la présence de cette guanosine amène à une production réduite de CHM de classe I à la surface des lymphocytes B de l'individu porteur (Coulombe-Huntington et al. 2009; Andres et al. 2010). La présence d'un SNP intronique (G > A) près du site d'épissage 5' de l'exon alternatif 5N de SCN1A (qui code pour une sous-unité α neuronale d'un canal à sodium) entraîne la production accrue de l'isoforme adulte (exclusion de l'exon 5N) moins réceptrice à la médication anti-épileptique dont SCN1A est la cible, augmentant ainsi la dose effectrice nécessaire (Tate et al. 2005; Heinzen et al. 2007).

3.4. Maladies et épissage alternatif

L'altération du processus d'épissage alternatif est l'une des causes principales permettant l'émergence des diverses maladies affligeant l'espèce humaine (Cooper et al. 2009) (Chabot and Shkreta JBC 2016). Ces altérations constituent un exemple frappant de l'impact de l'apparition de mutations sur le phénotype. De 15 à 60 % de l'ensemble des mutations ponctuelles responsables de l'apparition de maladies chez l'être humain agiraient au travers d'une altération de la régulation de certains événements d'épissage (Krawczak et al. 1992; Teraoka et al. 1999; Nembaware et al. 2004; Lopez-Bigas et al. 2005). Lorsque générées au sein des sites d'épissage, la majorité de ces mutations surviennent au niveau des dinucléotides invariables GT et AG des sites d'épissage 5' et 3' respectivement, soulignant la pression sélective pour la conservation de ces nucléotides essentiels à la reconnaissance des sites d'épissage (Krawczak et al. 1992).

Cette instabilité peut survenir auprès de régions régulatrices. SMN1 et SMN2 sont deux paralogues impliqués l'assemblage dans l'assemblage de la particule snRNP en facilitant l'association des sept protéines Sm aux snRNAs (Lefebvre et al. 1995; Neuenkirchen et al. 2008). SMN1 et SMN2 sont quasiment identiques au niveau de la séquence nucléotidique, n'ayant comme différence majeure qu'une mutation exonique de transition (C > T) à la position 6 de l'exon 7 de SMN2. Cette mutation entraîne l'exclusion de l'exon et la production majoritaire d'une isoforme courte inactive. La présence de SMN1 permet de compenser cette réduction d'isoformes longues actives, cependant l'inactivation de SMN1 par mutation ou délétion induit l'amyotrophie spinale (SMA), une maladie

neurodégénérative autosomale récessive qui cause une dégénérescence des motoneurones inférieures, amenant à une paralysie progression combinée à une atrophie musculaire (Lefebvre et al. 1995). La transition vers une production majoritaire d'isoforme courte inactive par la mutation découlerait de l'inactivation d'un potentiel ESE présent à cette position et lié par la protéine SRSF1 et/ou de la répression de l'utilisation du site d'épissage par hnRNP A1 suite à la possible création d'un ESI (Cartegni and Krainer 2002; Kashima and Manley 2003; Cartegni et al. 2006; Kashima et al. 2007). L'exclusion de l'exon 9 de l'ARNm mature du canal à chlorure transmembranaire CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), indispensable au bon fonctionnement de l'épithélium sécrétoire de tissus tels que les poumons, les intestins et le pancréas, est à la source de l'émergence de la fibrose kystique. Le niveau de cette exclusion dépendant du nombre de répétitions consécutives UG d'un motif polymorphique intronique situé en amont de l'exon 9 qui lorsqu'il excède douze, induit une fibrose kystique sévère par la génération d'un motif fort de liaison pour la protéine TDP-43 (Buratti et al. 2001; Buratti et al. 2004).

4. L'apoptose et l'épissage alternatif

L'une des caractéristiques du cancer est une dérégulation de l'apoptose. L'apoptose n'est que l'une des facettes de la mort cellulaire programmée (PCD) qui joue un rôle crucial dans le développement et le bien-être de l'organisme multicellulaire; les autres étant la mort induite par l'autophagie grâce à l'action des gènes ATG et la nécroptose ou nécrose programmée via l'action des récepteurs de mort de la voie extrinsèque de l'apoptose (Fuchs and Steller 2015).

À titre d'exemple de l'importance de l'apoptose dans l'homéostasie, l'activation de la mort cellulaire programmée par divers signaux extracellulaires permet l'élimination de lymphocytes autoréactifs au cours de la sélection négative qui autrement entraîneraient de graves réactions auto-immunes. Les lymphocytes non autoréactifs doivent aussi échapper à la mort lors de la sélection positive au travers d'une signalisation inhibitrice émise par la production de récepteurs antigéniques fonctionnels (BCR et TCR pour les lymphocytes B et T respectivement) et de costimulation (CD28 pour les cellules T, CD19 et CD40 pour les

cellules B) (Opferman and Korsmeyer 2003). Le processus d'apoptose est aussi indispensable à l'élimination de cellules excédentaires produites par les systèmes reproducteurs, nerveux et particulièrement immunitaires suite à la résolution d'une infection (Opferman and Korsmeyer 2003; Fuchs and Steller 2011).

Comme on l'avait mentionné précédemment, les milliards de cellules de notre corps sont bombardées au quotidien par divers stimuli stressants pouvant altérer leur intégrité. Ces stimuli peuvent induire des dommages importants dans le génome, entraînant par conséquent des mutations qui vont dérégler les fonctions physiologiques normales de la cellule. La détection de ces dommages et l'élimination par la suite des cellules porteuses irréparables qui faute de quoi pourrait mener à l'émergence et à la propagation de cellules malignes illustre bien le rôle capital joué par l'apoptose (Fuchs and Steller 2011; Fuchs and Steller 2015).

Finalement, les diverses phases de l'embryogenèse et de la croissance d'un organisme sont ponctuées de cycles de mort et de multiplication cellulaire. Ces cycles sont essentiels tant à l'organogénèse et à la formation de membres fonctionnels qu'à l'élimination de structures requises de façon transitoire ou inutiles tels des vestiges embryonnaires (Fuchs and Steller 2011). Par exemple, la maturation de la main nécessite une mort cellulaire concertée et locale médiée entre autres par l'action des membres de la famille Bcl-2 tels que Bax et Bak afin de permettre une individualisation adéquate des doigts qui assure la fonctionnalité de ce membre (Lindsten et al. 2000). Cette morphogenèse nécessite la mort à grande échelle de cellules de manière concertée et localisée. Ainsi, par un processus d'apoptose induite par la présence environnante de cellules apoptotiques, un petit nombre de cellules mourantes émettront des facteurs de mort qui entraîneront une réaction en chaîne. La mort peut aussi être source de vie. En effet, il y a été récemment découvert que les cellules apoptotiques mourantes excrètent des mitogènes dans leur environnement immédiat qui stimuleront la prolifération cellulaire, et par extension la régénérescence tissulaire ou d'organes tel que le foie (Fuchs and Steller 2015).

L'apoptose est modulée principalement par deux voies alternatives dont la sélection

découle du stimulus initiateur : la voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort (Fig. 12A) et la voie intrinsèque dépendante de la mitochondrie (Fig. 12B) (Adams 2003). Ces voies emploient leurs propres membres initiateurs de la famille des caspases (8, 9 et 12), des protéases à cystéines coupant le lien peptidique en aval d'un résidu aspartique situé dans un motif de reconnaissance Asp-X-X-X propre à chacune. Cependant, ces voies convergent vers des caspases effectrices communes (3, 6 et 7) qui sont les médiateurs clés de ce processus. Une connexion fonctionnelle centrée autour d'un membre protéique de la famille Bcl-2, à savoir Bid, existe entre ces deux voies. En effet, dans certains types cellulaires tels les hépatocytes, l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose par le récepteur de mort Fas n'est pas suffisante pour mener à terme la mort cellulaire et nécessite donc l'activation de la voie intrinsèque au travers du clivage par la caspase initiateur 8 de Bid (Yin et al. 1999). Une troisième voie associée à un stress du réticulum endoplasmique produit par des protéines mal-repliées ou une perturbation de l'homéostasie du calcium

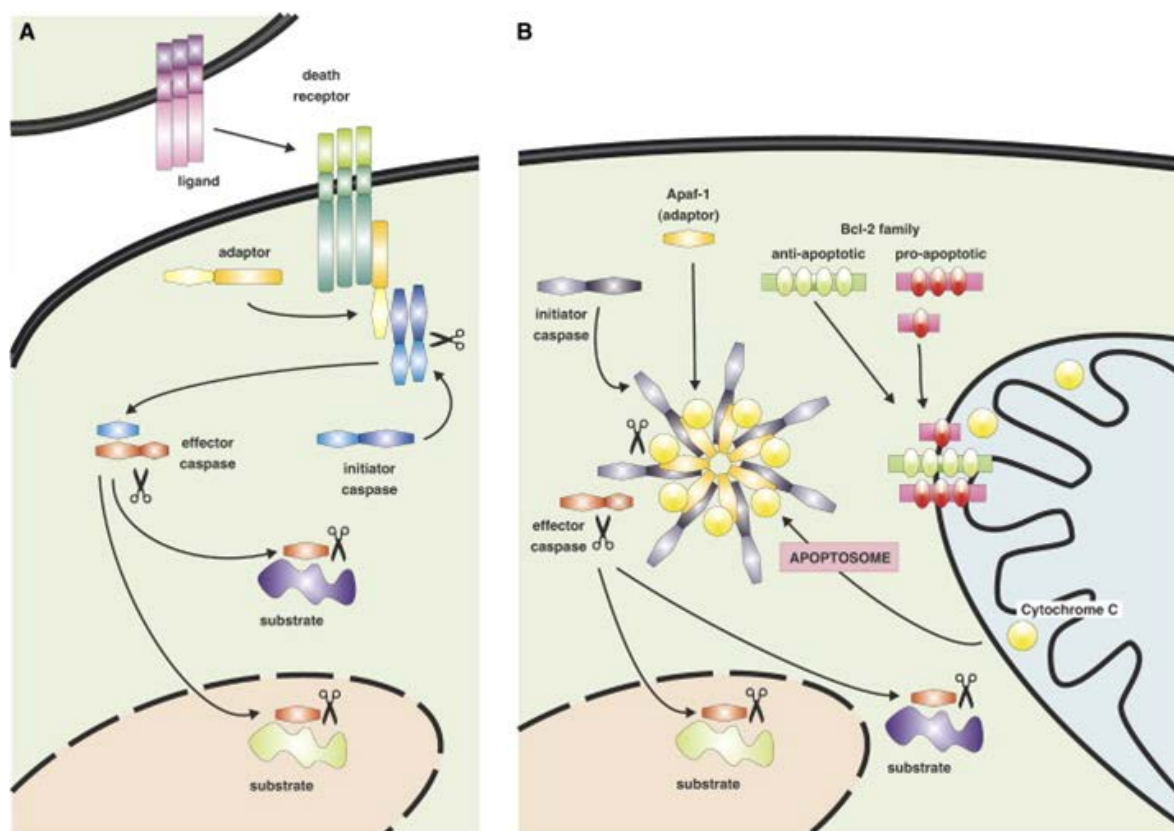


Figure 12: Apoptose cellulaire et ses deux voies majeures. (A) voie extrinsèque (B) et voie intrinsèque (Schwerk and Schulze-Osthoff 2005).

intracellulaire dont le réticulum endoplasmique en est le principal réservoir existe. Cette troisième voie nécessite une implication de la part de membres de famille Bcl-2, ainsi que de la mitochondrie (absorption de calcium) et de la caspase initiateur 12 chez la souris, possiblement la caspase 8 chez l'humain (Adams 2003).

4.1. Voie extrinsèque

L'activation de la voie extrinsèque est initiée par la liaison d'un ligand extracellulaire à un récepteur transmembranaire dit de mort de la grande famille des récepteurs TNF (TNFR). Un autre stimulus de cette voie est le retrait de facteurs de croissances et d'hormones stéroïdiennes. Parmi les nombreux ligands extracellulaires, les plus couramment étudiés et les mieux caractérisés de cette voie sont FAS, TNF, APO2L/TRAIL et les lipopolysaccharides (LPS) (Ashkenazi 2002). La liaison des ligands aux récepteurs transmembranaire va induire leur trimérisation. Ainsi, ceux-ci maintenant fonctionnels vont par la suite transmettre ce signal d'initiation à des protéines adaptatrices associées à leurs domaines de mort (DD), principalement FADD (*FAS-associated death domain*) et TRADD (*TNFR-associated death domain*) (Thornberry and Lazebnik 1998; Hengartner 2000; Strasser et al. 2000; Ashkenazi 2002).

L'association des procaspases initiateur 8 et 10 à la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated via death domain) entraîne la formation du complexe de signalisation inducteur de mort (DISC). Cette association activatrice des caspases à la protéine adaptatrice FADD peut être bloquée par l'action de l'inhibiteur cytoplasmique FLIP. Cette protéine est similaire au niveau de sa séquence avec la caspase 8 à l'exception des résidus catalytiques. Ainsi, celle-ci agit comme un leurre au niveau de la protéine adaptatrice FADD (Thornberry and Lazebnik 1998; Hengartner 2000). Les caspases 8 et 10 ainsi activées pourront à leur tour activer par clivage les caspases effectrices et la protéine Bid.

4.2. Voie intrinsèque

Divers stimuli déclenchent l'initiation de cette voie, tels que les dommages à l'ADN, l'exposition à des agents chimiothérapeutiques ou à de l'irradiation, des défauts dans le cycle cellulaire, la perte de l'attachement à la matrice extracellulaire, l'hypoxie et la perte

de facteurs de survie (Adams 2003; Fuchs and Steller 2011; Fuchs and Steller 2015). La présence de dommages à l'ADN entraîne l'induction de la voie de la DDR, d'où l'implication critique du facteur de transcription p53 pour cette voie contrairement à celle extrinsèque. Le facteur p53 peut accroître aussi l'expression des récepteurs de mort cellulaire, renforçant l'engagement des cellules dans le processus apoptotique et soulignant à nouveau l'interconnectivité entre les deux voies de l'apoptose (Ashkenazi 2002). La décision d'aller en apoptose découlera donc de la capacité à la machinerie de réparation de surmonter ce stress au niveau de l'intégrité génomique.

La mitochondrie est la pièce centrale de cette voie. La perméabilisation de sa membrane externe (MOMP) permet le relargage au sein du cytoplasme de protéines indispensables à l'activation de la machinerie de dégradation de l'apoptose qui étaient auparavant situées dans l'espace intramembranaire mitochondrial. Parmi ces protéines se trouvent le cytochrome C indispensable à la formation de l'apoptosome, AIF qui induit l'apoptose de manière indépendante des caspases et les différents inhibiteurs des IAPs (protéines inhibitrices d'apoptose), soient SMAC/DIABLO et HTRA2/Omi. Ces deux dernières protéines libérées pourront alors aller s'associer aux IAPs et ainsi lever leur répression de l'activité des caspases. L'induction de cette perméabilisation découlera du côté où penchera la balance entre les différents membres anti et pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Adams 2003; Youle and Strasser 2008; Tait and Green 2010).

La protéine phare a été isolée comme étant un possible oncogène surexprimé par la translocation chromosomique t (14,18) dans les lymphomes de cellules folliculaires (d'où le nom *B-cell lymphoma-2*) (Bakhshi et al. 1985; Tsujimoto et al. 1985). Par la suite, il fut démontré que la surexpression de Bcl-2 entravait l'induction de la mort cellulaire, montrant par le fait même qu'une dérégulation de l'apoptose était l'un des facteurs clés de la tumorigénèse (Vaux et al. 1988). Une caractéristique commune à l'ensemble de ces protéines de la famille Bcl-2 est la présence d'au moins un domaine d'homologie à la protéine phare Bcl-2 (BH) qui contient une séquence conservée codant pour une hélice alpha. Ces protéines possèdent en C-terminal un domaine transmembranaire qui permet leur relocalisation du côté cytosolique de la membrane externe de la mitochondrie. Ces

protéines sont divisées en trois grands groupes structurellement différents. Le premier groupe, anti-apoptotique, est défini par la présence des quatre domaines d'homologie à Bcl-2 au sein de ses membres (BH1, 2, 3 et 4) et comprend Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-2A1, Bcl-B et Mcl-1 (ou BCL2L11). Le second groupe, pro-apoptotique, est caractérisé par la perte du quatrième domaine (BH4) et comporte Bax, Bak et Bok. Finalement, le troisième groupe, pro-apoptotique également, est le plus divergent structurellement, ne conservant que le troisième domaine d'homologie (BH3). Ce groupe inclut les protéines Puma, Bid, HRK, BMF, Noxa, Bim, Bad et Bik (Adams 2003; Youle and Strasser 2008; Tait and Green 2010).

Le mécanisme exact par lequel les membres de la famille BH2 régulent la MOMP et l'activité des caspases reste encore nébuleux. Au niveau de la MOMP, trois modèles existent qui sont surtout au niveau du rôle clé joué par les membres de la famille Bcl-2 à domaine BH3 unique régule l'apoptose. Ainsi ces protéines peuvent soit activer directement (Fig. 13A) les membres pro-apoptotiques BH4 indépendant de cette même famille (particulièrement Bak et Bax) ou soit indirectement (Fig. 13B) par la levée de la répression exercée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 suite à leur inhibition ou soit être en mesure d'effectuer à la fois ces deux fonctions (Fig. 13C) (Adams 2003). Suite à la levée de leur répression, les protéines Bax et Bak pourront s'oligomériser.

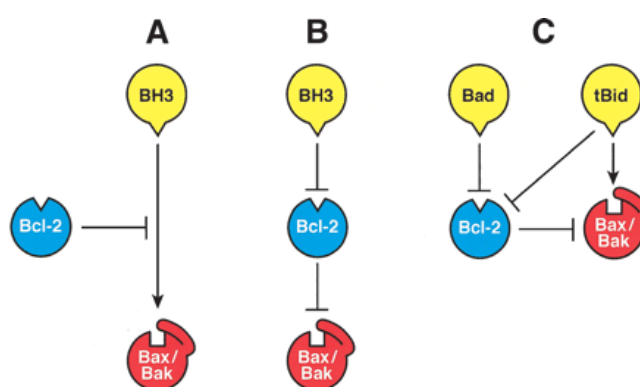


Figure 13: Modèles de la relation fonctionnelle entre les membres de la famille Bcl-2.

(A) Le groupe de la famille Bcl-2 à domaine BH3 unique, une fois activé, s'associe directement aux membres pro-apoptotiques Bax et Bak (B) ou inhibe les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, abolissant ainsi leur répression des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak déjà ancrées via leur domaine C-terminal à la membrane externe mitochondriale. (C) Modèle où certaines protéines à domaine BH3 unique peuvent seulement inhiber Bcl-2 ou peuvent à la fois inhiber Bcl-2 et inactiver Bax et Bak (comme tBid) (Adams 2003).

Ainsi, ils stabiliseront des pores lipidiques déjà présents au niveau de cette membrane ou y entraîneront la formation de nouveaux pores protéiques avec l'aide de protéines transmembranaires déjà présentes. Ces pores, les MACs (*mitochondrial apoptosis-induced channel*), permettront la sortie des protéines mentionnées précédemment de l'espace intramembranaire mitochondrial (Tait and Green 2010).

Le cytochrome C relâché va s'associer à Apaf1 (*apoptotic peptidase-activating factor 1*), entraînant ainsi un changement de conformation et l'oligomérisation de celui-ci. L'oligomère d'Apaf-1 va par la suite recruter la procaspase 9 via une interaction avec son prodomaine et qui combiné au cytochrome C et à du dATP va former l'apoptosome, un cercle protéique heptamérique qui constitue en quelque sorte l'holoenzyme de la caspase 9 (Adams 2003; Youle and Strasser 2008; Tait and Green 2010). Ce complexe macromoléculaire qu'est l'apoptosome joue non pas un rôle d'initiateur, mais plutôt d'amplificateur du signal apoptotique, son inactivation ne bloquant pas la cascade apoptotique, mais réduisant fortement son efficacité. Le clivage et la dimérisation de la caspase 9 va activer l'apoptosome, le point de non-retour de l'apoptose, entraînant par la suite l'activation des caspases effectrices et la destruction de la cellule (Adams 2003; Youle and Strasser 2008; Tait and Green 2010).

4.3. Implication de l'épissage alternatif

À toutes les différentes étapes de ces deux voies alternatives principales de l'apoptose, en partant des récepteurs de mort de la voie extrinsèque aux caspases effectrices en passant par les membres de la famille Bcl-2 de la voie intrinsèque, le pré-ARNm de la majorité des acteurs ou intermédiaires impliqués dans ce processus contiennent des événements d'épissage alternatif et peuvent ainsi produire des isoformes aux fonctions potentiellement diamétralement opposées (Fig. 14) (Schwerk and Schulze-Osthoff 2005).

Cette association fonctionnelle entre l'épissage alternatif et la régulation du processus apoptotique est en fait bidirectionnelle. L'activation de la mort cellulaire elle-même peut altérer le profil des modifications post-traductionnelles imposées aux facteurs d'épissage. En effet, l'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose cellulaire (via Fas) accroît la

production de novo de céramide à partir de sphingolipides. Cette production endogène de céramide entraîne l'activation de deux familles de phosphatases sérines/thréonines, mais dont uniquement celle de la phosphatase PP1 a pour substrats les protéines SR, ce qui a pour conséquence la déphosphorylation et la modulation de l'activité régulatrice de ce groupe de facteurs d'épissage (Chalfant et al. 1999; Chalfant et al. 2001; Chalfant et al. 2002). À l'opposé, l'induction de l'apoptose via Fas ou irradiation gamma ou UV induit une phosphorylation accrue des résidus sérines des protéines SR menant à une interaction avec les composantes du complexe U1 snRNP (Utz et al. 1998). Cette phosphorylation, qui survient tôt dans le processus d'apoptose par une stimulation de l'activité de SRPK1, est perdue lors des étapes tardives de la mort cellulaire (Kamachi et al. 2002). Ainsi, pour mener à terme le processus apoptotique, les facteurs d'épissage subiront des cycles de modifications post-traductionnelles réversibles qui entraîneront les changements requis au niveau de la régulation des profils d'épissage clés.

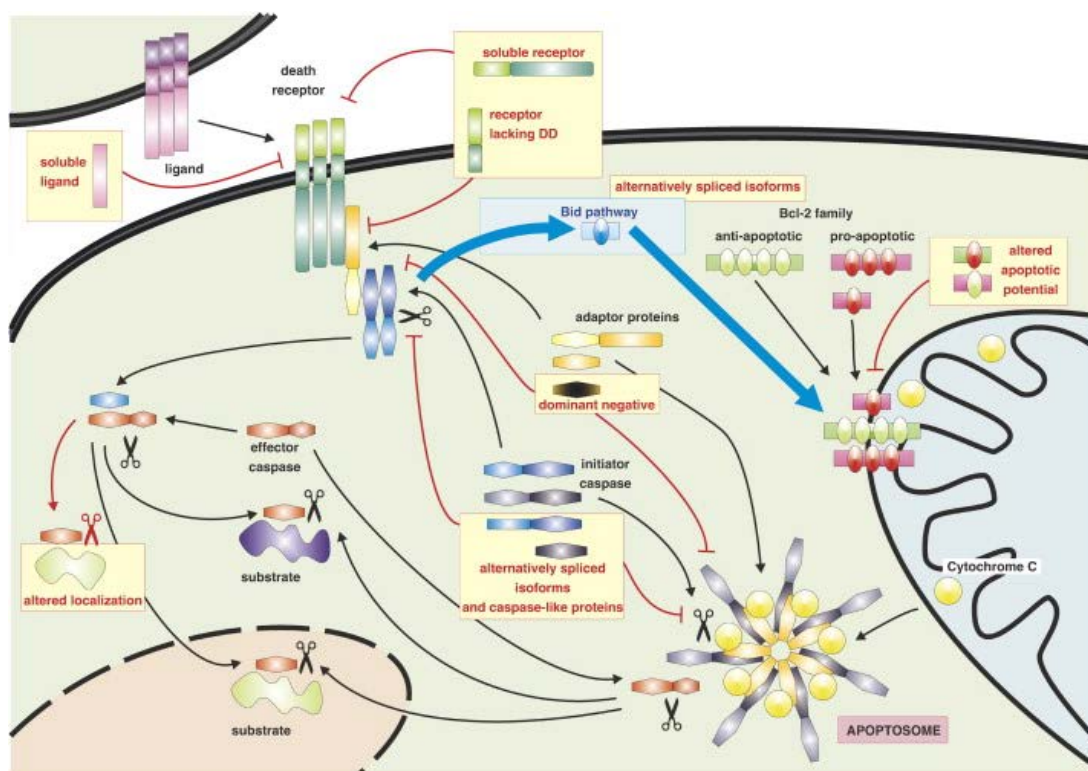


Figure 14 : Régulation de l'apoptose cellulaire par l'épissage alternatif. (Schwerk and Schulze-Osthoft 2005).

Cette altération des modifications post-traductionnelles induites auprès des facteurs d'épissage pourrait découler de l'inactivation/activation des enzymes responsables. En

effet, les caspases ont aussi un impact au niveau de la régulation des profils d'épissage alternatif. Les kinases de protéines SR SRPK1 et 2 sont inactivées via un clivage catalysé par les caspases initiateuses 8 et 9 respectivement, alors que la topoisomérase I est la cible des caspases effectrices 3 et 6 (Samejima et al. 1999; Kamachi et al. 2002). Plusieurs composantes du spliceosome ou facteurs protéiques régulateurs font partie des substrats des caspases effectrices et initiateuses activées lors de l'apoptose. À titre d'exemple, celles-ci peuvent inactiver la protéine U1-70K et les protéines hnRNP C1 et C2 (Casciola-Rosen et al. 1994; Waterhouse et al. 1996).

L'épissage alternatif de pré-ARNm codant pour les récepteurs de mort de la voie extrinsèque donne la possibilité, dans plusieurs cas, de produire des isoformes solubles de ceux-ci. Ces isoformes vont servir de leurres anti-apoptotiques, séquestrant les ligands pro-apoptotiques ou les récepteurs transmembranaires qui autrement auraient entraîné l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Par exemple, l'épissage alternatif du pré-ARNm du récepteur Fas, un membre de la famille de récepteurs TNF, entraîne la production de trois isoformes solubles, suite à l'excision de l'exon 6 codant pour le domaine transmembranaire, qui permettent à la cellule de résister à l'activation de la cascade apoptotique par anticorps antagonistes (Cheng et al. 1994; Cascino et al. 1995; Cheng et al. 1995). Parfois, l'altération fonctionnelle de ces récepteurs peut s'effectuer au niveau des domaines protéiques nécessaires à la transduction du signal pro-apoptotique aux protéines adaptatrices. Ainsi, une isoforme anti-apoptotique dominante négative du récepteur FAS interrompt la cascade de signalisation apoptotique par la perte de son domaine de mort DD due à un changement de cadre de lecture induit par l'excision de l'exon alternatif 8 (25 nt) (Cascino et al. 1996).

Du côté des multiples protéines adaptatrices, l'isoforme longue majoritaire d'Apaf-1 (Apaf-1XL) découle de l'insertion de 33 nt par l'utilisation d'un site d'épissage 5' alternatif dans l'exon 3 du domaine N-terminal et de l'ajout d'une répétition WD-40 supplémentaire (exon 17a) dans le domaine C-terminal. Ce WD-40 additionnel est essentiel à l'assemblage d'un apoptosome fonctionnel suite au relâchage du cytochrome C de l'espace intermembranaire mitochondrial. En effet, sa présence permet d'induire un changement conformationnel à la

protéine adaptatrice suite à son association avec le cytochrome C, entraînant ainsi l'oligomérisation d'Apaf-1 et sa liaison avec la pro-caspase initiatrice 9 (Benedict et al. 2000). Cette caspase elle-même peut produire plus qu'une isoforme via l'épissage alternatif de son pré-ARNm. La production de l'isoforme courte caspase-9S (exclusion des exons 3, 4, 5 et 6) résulte en la formation d'un apoptosome inactif par la perte de son site catalytique. Cette isoforme anti-apoptotique exerce un effet dominant négatif en compétitionnant directement avec une caspase 9 intacte pour l'association via son prodomaine à Apaf-1 (Seol and Billiar 1999). La production accrue de céramide endogène par l'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose va favoriser la formation de l'isoforme longue pro-apoptotique par l'entremise de PP1 (Chalfant et al. 2002). D'autres caspases tant initiatrices qu'effectrices peuvent produire une multitude d'isoformes via l'épissage alternatif, comme c'est le cas pour la caspase initiatrice 2 où la surexpression de la protéine hnRNP A1 génère une isoforme protéique anti-apoptotique plus courte suite à un changement de cadre de lecture (Wang et al. 1994; Jiang et al. 1998).

Finalement, au niveau des membres de la famille Bcl-2 impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose, l'épissage alternatif de la protéine à domaine BH unique (BH3) Bid produit de multiples isoformes ayant leur propre profil d'expression tissulaire et de distribution intracellulaire. Parmi celles-ci, les isoformes Bid_L et Bid_{EL} (plus longue en N-terminal que Bid_L) possédant toutes deux le domaine BH3 nécessaire à l'hétérodimérisation avec d'autres membres de la famille Bcl-2 induisent l'apoptose cellulaire. Cette activation est entravée par l'expression de l'isoforme anti-apoptotique Bid_S (absence du domaine BH3). Dans le cas de l'isoforme Bid_{ES} (version tronquée de Bid_L) qui possède un domaine BH3 incomplet, celle-ci induit l'apoptose cellulaire à un degré moindre que les deux isoformes pro-apoptotiques précédentes (Wang et al. 1996; Renshaw et al. 2004). Au sein de cette famille de protéines, l'un des membres parmi lesquels l'étude de la régulation de l'épissage alternatif de son pré-ARNm a été la plus exhaustive est sans conteste Bcl-x.

5. *Bcl-x*

Bcl-x, ou BCL2L1 (*Bcl-2 like-1*) fut d'abord isolé par buvardage de type Southern lors de la recherche de protéines reliées à Bcl-2 qui partageaient son implication de la régulation de

l'épissage alternatif. Bcl-x possède une forte homologie au niveau de sa séquence d'acides aminés (44%) avec Bcl-2 (Boise et al. 1993). Bcl-x est un petit gène de trois exons dont le codon d'initiation de la traduction est situé dans la première moitié du deuxième exon (Grillot et al. 1997). Étant membre de la famille Bcl-2, il est donc un composant clé de la voie intrinsèque de l'apoptose puisqu'il contrôle la relâche du cytochrome C de l'espace intramembranaire de la mitochondrie en stabilisant ou inhibant la formation des pores dans la membrane externe selon l'isoforme produite par l'épissage alternatif de son pré-ARNm. En effet, l'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-x permet la production de deux isoformes majeures et de cinq isoformes mineures (Fig. 15).

5.1. Isoformes majeures de Bcl-x

L'existence de sites d'épissage 5' en compétition au niveau du deuxième exon du pré-ARNm de Bcl-x permet la production par l'épissage alternatif de deux isoformes ayant un impact fondamentalement différent sur la régulation du processus d'apoptose. La sélection du site d'épissage proximal entraîne la production de l'isoforme longue de 233 acides aminés Bcl-xL qui possède l'ensemble des domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1 à 4). L'utilisation du site d'épissage distal résulte en l'excision de 189 nt (conservation du cadre de lecture) et la production de l'isoforme courte Bcl-xS (170 acides aminés) où les domaines BH1 et 2, soit la région avec la plus grande homologie avec la protéine Bcl-2, sont absents du transcrit mature.

Bcl-xL, par la conservation des quatre domaines BH, joue un rôle anti-apoptotique, empêchant en outre l'activation de l'apoptose suite à un sevrage (retrait) de facteur de croissance (IL-3) dans une lignée murine prolymphocytaire (Boise et al. 1993). Sa surexpression confère aux cellules une résistance face à une exposition à divers réactifs cytotoxiques ou radiation ionisante (Amundson et al. 2000). Au contraire, du côté de Bcl-xS, celui-ci exerce une fonction pro-apoptotique, bloquant en outre la résistance médiée par la surexpression de la protéine étalon Bcl-2 face à l'initiation de l'apoptose induite par le sevrage d'IL-3 (Boise et al. 1993). Bcl-xS agit comme un régulateur dominant du processus d'apoptose cellulaire, réussissant à contrer la prévention de la mort cellulaire par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL lorsque celle-ci est induite (Boise et al. 1993;

Minn et al. 1996). En effet, à partir d'un ratio de 1 pour 4, l'isoforme courte supplante l'impact anti-apoptotique de l'isoforme longue (Minn et al. 1996).

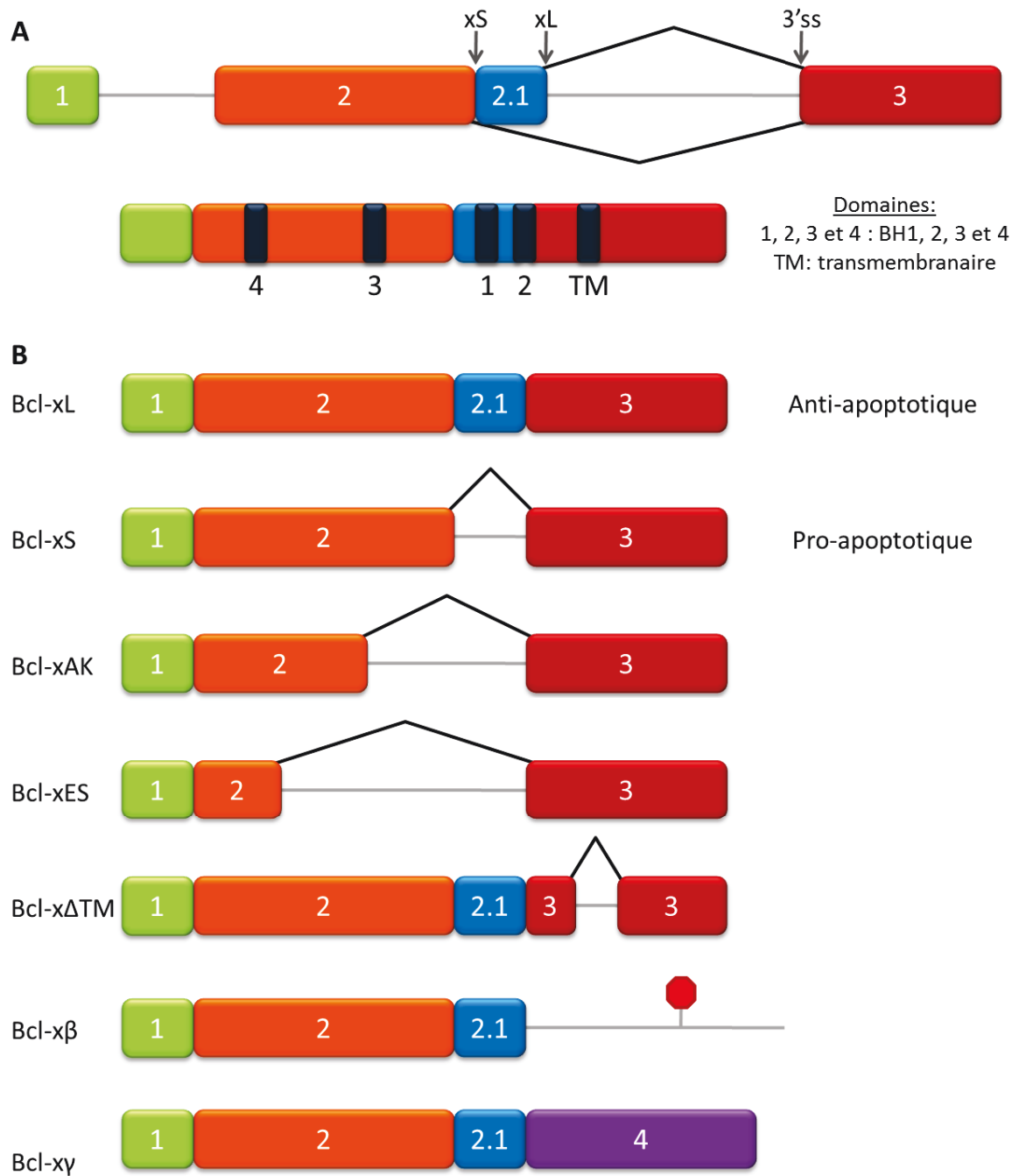


Figure 15: L'épissage alternatif de Bcl-x. (A) pré-ARNm de Bcl-x et position des domaines BH et transmembranaire (B) L'épissage alternatif de Bcl-x produit 2 isoformes majeurs (Bcl-xS et Bcl-xL) et 5 isoformes mineurs (Bcl-xAK, Bcl-xES, Bcl-xΔTM, Bcl-xβ et Bcl-xy). Adapté de la thèse de T. Revil, 2009.

Le ratio d'expression de ces deux isoformes varie grandement selon le tissu étudié, (Boise et al. 1993; Krajewski et al. 1994; Gonzalez-Garcia et al. 1995). L'isoforme Bcl-xL est surexprimée dans les cellules post-mitotiques différenciées comme les cellules neuronales matures et les kératocytes différenciées, alors que l'isoforme pro-apoptotique courte est surexprimée dans les tissus à haut taux de renouvellement ou sujet à des phases d'involution (comme les testicules, ovaires ou ganglions lymphatiques) ou dans des cellules nécessitant un contrôle temporel de leur expression (par le biais d'une dépendance aux hormones de croissances ou à d'autres signaux extracellulaires) telle que les lymphocytes T activés (Boise et al. 1993; Krajewski et al. 1994). L'isoforme longue est aussi surexprimée dans les cellules en croissance, en particulier dans les cellules cancéreuses où sa surexpression est associée à un faible pronostic et à une résistance aux traitements chimiothérapeutiques (Gonzalez-Garcia et al. 1994; Sumantran et al. 1995). De son côté, Bcl-xS sensibilise les cellules à divers inducteurs d'apoptose dont des agents cytotoxiques et sa surexpression dans diverses lignées cellulaires cancéreuses provoque l'activation de la mort cellulaire programmée (Clarke et al. 1995; Sumantran et al. 1995). Ainsi, l'induction d'un changement via l'utilisation de diverses technologies (oligonucléotides hybrides synthétiques ou antisens) du ratio des isoformes produites dans les cellules cancéreuses où l'isoforme longue anti-apoptotique est surexprimée en faveur de Bcl-xS constitue une approche thérapeutique prometteuse dans la lutte contre le cancer (Taylor et al. 1999; Sazani and Kole 2003; Villemare et al. 2003). À l'instar d'autres membres de la famille Bcl-2, les deux isoformes majeures de Bcl-x ont la capacité de former des hétérodimères avec les membres de cette famille de régulateurs de l'apoptose cellulaire (Sato et al. 1994; Minn et al. 1996; Chang et al. 1999; Lindenboim et al. 2001).

5.2. Isoformes mineures de Bcl-x

Outre les deux isoformes majeures, cinq isoformes mineures de Bcl-x ont été découvertes au cours des années, certaines n'étant exprimées que dans quelques types cellulaires précis ou au niveau de la souris. Très peu est connu sur le contrôle de leur expression et sur la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-x qui permet de générer les transcrits codant pour ces isoformes. À l'instar des isoformes majeures, la plupart de ces isoformes ont un impact important sur la régulation de la survie cellulaire.

Bcl-xAK (*atypical killer*) est une isoforme de 138 acides aminés faiblement exprimée dans les mélanocytes normaux humains, ainsi que plusieurs lignées de mélanomes, de cancer du col utérin (HeLa) et de cancer de l'ectoderme neural (PFSK-1). La surexpression de cette isoforme, où la partie centrale du pré-ARNm de Bcl-x contenant les domaines BH3 et BH1 est exclue de l'ARNm mature, induit l'apoptose cellulaire, constituant par le fait même le premier membre pro-apoptotique de la famille de protéines Bcl-2 dont le domaine BH3 est absent. Ainsi, cela suggère un nouveau mécanisme d'induction de l'apoptose par cette isoforme, d'autant plus que l'activation de la caspase effectrice 3 par clivage n'est pas induite par sa surexpression et que contrairement à l'isoforme Bcl-xS, celle-ci est présente à la fois au niveau du cytosol et de la mitochondrie (Hossini et al. 2006).

L'ARNm mature d'une autre isoforme plus courte, Bcl-xES (*extra short*), ne contient que le domaine BH2 et BH4, ainsi que le domaine transmembranaire en C-terminal et une partie du domaine LOOP (hélice hydrophile alpha-6) important pour la formation de pores dans la membrane mitochondriale. Cette isoforme est exprimée à des degrés divers dans plusieurs lignées cellulaires issues de tissus sains ou malins à l'exception des tissus sains des ovaires, seins, testicules et poumons. La surexpression de Bcl-xES protège les cellules contre l'induction de l'apoptose par diverses drogues telle la camptothécine par la prévention de l'oligomérisation de Bax et la séquestration d'Apaf1 (Schmitt et al. 2004).

L'isoforme Bcl-xΔTM (*transmembranaire*), de poids intermédiaire entre Bcl-xs et Bcl-xL (environ 24 kDa) et induite lors de l'activation des lymphocytes (B et T) murins, découle de l'utilisation de sites d'épissage non canoniques au sein de l'exon 3 (dont le site d'épissage 5' est situé 12 nt en aval du site d'épissage 3' de l'intron 2), entraînant la perte de 70 nt (le domaine transmembranaire) et l'insertion de 21 nouveaux acides aminés par ce changement du cadre de lecture. Bcl-xΔTM, diffuse dans le cytosol de par la perte de son domaine transmembranaire, prévient l'apoptose cellulaire induite par le sevrage (retrait) de facteur de croissance, en l'occurrence ici IL-3 (Fang et al. 1994).

Une autre isoforme, Bcl-x β , exprimée dans de nombreux tissus chez la souris, le rat et l'humain, découle de l'inutilisation des deux sites d'épissage 5' au niveau de l'exon 2 (Gonzalez-Garcia et al. 1994; Gonzalez-Garcia et al. 1995; Shiraiwa et al. 1996; Ban et al. 1998). Ainsi, cette isoforme, qui contient les 4 domaines BH, conserve dans son ARNm mature et traduit une partie de l'intron 2 de Bcl-x (21 acides aminés dans le cas de la souris, 44 pour le rat et 38 pour l'humain) (Gonzalez-Garcia et al. 1994; Shiraiwa et al. 1996; Ban et al. 1998). Chez l'humain, une région de 289 nt située au sein du 5'UTR est en plus excisée lors de la production de l'isoforme (Ban et al. 1998). L'implication de Bcl-x β au niveau de la régulation de l'apoptose cellulaire semble être diamétralement opposée selon le type cellulaire et l'organisme dans lequel celle-ci est exprimée. En effet, sa surexpression dans des neurones primaires de souris ou embryonnaires de poulet accroît la survie cellulaire après sevrage des neurotrophines NGF (*nerve growth factor*) ou BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (Gonzalez-Garcia et al. 1995; Middleton et al. 1996). Au contraire, cette même surexpression dans une lignée promyéloïde de rat (FDC-P1) accroît la mort cellulaire malgré la présence du facteur de croissance IL-3 (Shiraiwa et al. 1996). Chez l'humain, l'association de la protéine avec Bax souligne un rôle potentiel dans la régulation de l'apoptose (Ban et al. 1998). La surexpression endogène de Bcl-x β dans le système nerveux central fœtal du rat soutient un rôle important dans le développement (Yamada et al. 2000). Finalement, l'utilisation de dexaméthasone (un glucocorticoïde synthétique) stimule la production de l'isoforme dans les lymphocytes T (Bianchini et al. 2006).

Trois transcrits différant au niveau de la composition de leur 3'UTR sont traduits pour produire la cinquième et dernière isoforme mineure de Bcl-x, soit Bcl-x γ (235 acides aminés), dans les lymphocytes T murins double positifs (CD4⁺ CD8⁺) et au niveau de l'œil chez la souris (Yang et al. 2002). Ces transcrits matures, générés à partir des promoteurs P2 et P3 murins (Pecci et al. 2001), sont produits par l'utilisation du site d'épissage xL et d'un site d'épissage 3' alternatif qui permet l'incorporation dans l'ARNm mature d'un nouvel exon (exon 4), générant un nouveau domaine C-terminal codant pour 47 acides aminés (Yang et al. 1997). La diversité nucléotidique au niveau de la région du 3' UTR découle de la combinaison alternative de quatre exons spécifiques à l'isoforme Bcl-x γ : (1) exons 6 et

8 (2) exons 5, 6 et 8 (3) exons 6, 7 et 8 (Yang et al. 2002). À l'instar de Bcl-x Δ TM, Bcl-x γ est majoritairement concentrée au niveau du cytosol dû à l'absence du domaine transmembranaire (exon 3). Contrairement aux autres isoformes de Bcl-x, cette isoforme, induite après l'activation des thymocytes par la liaison de CD3 et CD28 et l'interaction entre les récepteurs de cellules T (TCR) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) n'affecte pas la survie cellulaire, mais plutôt favorise la prolifération cellulaire en accroissant le nombre de cellules entrant dans le cycle cellulaire et la division cellulaire, conférant ainsi un avantage développemental lors de la maturation des lymphocytes et permettant la génération de cellules à mémoire T (Yang et al. 1997; Ye et al. 2002; Kissler et al. 2004).

5.3. Régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x

Cette section sera consacrée à l'étude du contrôle de la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-x menant à la production des deux isoformes majeures, soit Bcl-xS et Bcl-xL. Dû à son implication critique dans un processus aussi crucial pour la régulation du cycle de vie et mort d'une cellule qu'est l'apoptose, l'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-x est finement et rigoureusement régulé (Fig. 16). Au cours du quart de siècle suivant la découverte du gène Bcl-x, un nombre important d'éléments régulateurs cis situés au sein de son pré-ARNm et plusieurs facteurs protéiques associés et voies de signalisation régulatrices ont été isolés et caractérisés, plusieurs par des membres de notre équipe de recherche. Un criblage à l'ARNi a révélé l'existence de 160 facteurs dont la déplétion accroît l'utilisation du site apoptotique xS (Moore et al. 2010; Wang and Silver 2010). À cela s'ajoute l'impact de structures secondaires régulatrices et du processus transcriptionnel même. Ces multiples facteurs convergent et interagissent ensemble au sein d'une régulation complexe qui déterminera lequel des deux sites d'épissage 5' en compétition de l'intron 2 sera sélectionné et ainsi laquelle des deux isoformes majeures de Bcl-x sera subséquemment produite. Le petit gène Bcl-x constitue donc un modèle idéal pour l'approfondissement de la recherche au niveau de l'aspect combinatoire de la régulation du processus d'épissage alternatif, le nouveau défi dans l'étude de ce processus de maturation des pré-ARNm.

La surexpression de la protéine SRSF1 dans les cellules HEK 293 (cellules embryonnaires de rein) et HeLa accroît la production de l'isoforme Bcl-xL (Paronetto et al. 2007; Cloutier et al. 2008). L'activité et l'expression de SRSF1, comme tout facteur d'épissage, peuvent être modulées par diverses voies de signalisation et modifications post-traductionnelles subséquentes. Ainsi, l'utilisation dans les cellules HeLa d'un inhibiteur de la kinase AURKA impliquée dans la régulation du cycle cellulaire entraîne une diminution de l'expression du facteur d'épissage et par conséquent, une utilisation augmentée du site xS (Moore et al. 2010; Wang and Silver 2010). L'activité de SRSF1 est modulée entre autres par la protéine *SR-like* Pinin, un membre du complexe EJC (Li et al. 2003). La déplétion de Pinin par shRNA dans les cellules MCF-7 (adénocarcinome du sein humain) augmente l'utilisation du site apoptotique xS au travers d'un accroissement de la production de l'isoforme longue métaboliquement inactive de SRSF1 (Leu et al. 2012). Dans les cellules HEK 293T, la production accrue de l'isoforme Bcl-xL promue par la surexpression de ce

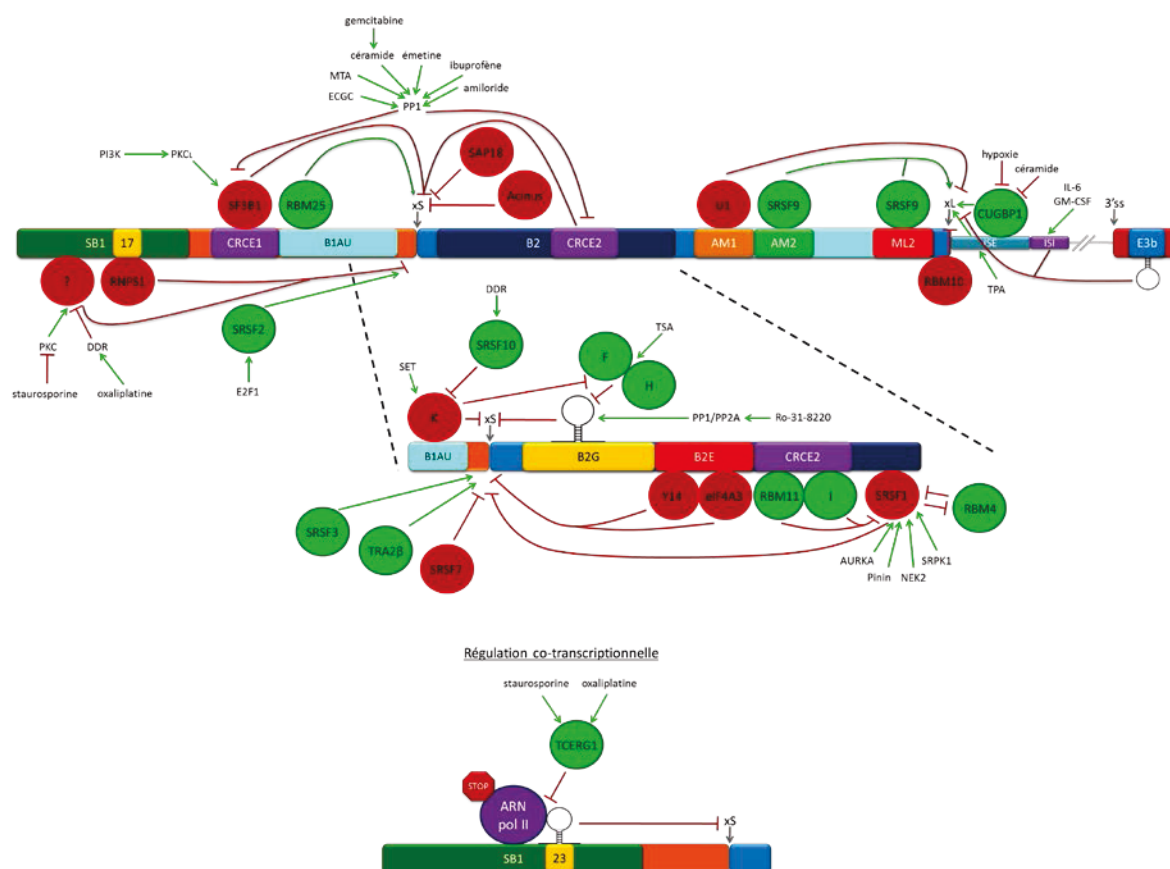


Figure 16: La régulation complexe de l'épissage alternatif de Bcl-x. Schéma représentant l'ensemble des régions régulatrices et des facteurs d'épissage pour lesquels une implication dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x a été trouvée.

facteur d'épissage est inhibée par la déplétion par ARNi de la kinase sérine/thréonine centrosomale NEK2 et de la SRPK1, kinases qui interagissent et phosphorylent *in vivo* SRSF1 (Naro et al. 2014).

SRSF1 lie directement le motif CGGCGG situé entre les deux sites d'épissage 5' alternatifs, 66 nt en aval du site xS, compétitionnant par le fait même avec la liaison de la protéine RBM4 à cette région (Wang et al. 2014). Ce motif est au cœur de l'élément B2, une région de 77 nt dont l'extrémité 5' est située 11 nt en aval du site d'épissage xS (Garneau et al. 2005). RBM4, lorsque surexprimé dans les lignées cellulaires 293 et H157 (carcinome épidermoïde pulmonaire), contrecarre l'action de SRSF1 et diminue la production de l'isoforme Bcl-xL. De plus, le facteur RBM4 est sous-exprimé dans les cellules cancéreuses pulmonaires, pancréatiques et mammaires, en cohérence avec son rôle pro-apoptotique (Wang et al. 2014). L'interaction entre SRSF1 et l'exon 2 du pré-ARNm de Bcl-x est grandement diminué par la liaison possiblement à un segment polyU situé au cœur de l'élément B2 de la protéine RBM11 dont la surexpression, au sein de cellules HEK 293T, accroît la sélection du site apoptotique xS. L'expression de RBM11 est restreinte spécifiquement au cervelet, aux testicules, au cerveau et dans une moindre mesure aux reins, et fluctue au cours des étapes du développement (Pedrotti et al. 2012). L'action de SRSF1 est aussi contrée par la liaison de la protéine hnRNP I/PTB à une région riche en pyrimidines (CCUUUUUCUCCUUC) située au cœur de l'élément B2. Dans les cellules HEK 293T, la déplétion par ARNi d'hnRNP I fait pencher le ratio xS/xL en faveur de l'isoforme anti-apoptotique et accroît la liaison de SRSF1 à son motif au sein de l'élément B2. Cette implication de la protéine hnRNP I dans la régulation du processus d'apoptose est mis en évidence dans les glioblastomes où les lignées avec une expression élevée de la protéine ont une production accrue de la protéine pro-apoptotique Bcl-xS et une sensibilité plus importante aux agents chimiothérapeutiques tel que temozolomide (agent alkylant) que celles à faible niveau d'expression (Bielli et al. 2014).

Cet élément B2, véritablement point de convergence, est aussi le site de liaison sur le pré-ARNm de Bcl-x de plusieurs autres facteurs d'épissage qui affectent négativement (SRSF7)

ou positivement (SRSF3 et TRA2 β) l'utilisation du site apoptotique xS lorsque surexprimés dans les cellules HEK 293T (Bielli et al. 2014). La délétion complète de l'élément B2 montre que l'activité globale cumulative de cet élément est la stimulation de l'utilisation d'épissage apoptotique xS. Dans un but de mieux définir les régions clés au sein de l'élément, il fut déterminé par une série de délétions que la majeure partie de cette activité stimulatrice de l'élément B2 est concentrée au niveau de ses 30 premiers nt, une région riche en guanosines rebaptisée B2G (Garneau et al. 2005). L'intégrité de B2G est essentielle pour l'action pro-apoptotique de deux des quatre membres de la sous-famille de facteurs d'épissage hnRNP H, soient F et H, qui lient directement et individuellement ces répétitions de guanosines. En effet, la déplétion par ARNi de ces deux facteurs entraîne un accroissement de la production de l'isoforme anti-apoptotique dans les cellules HeLa (Garneau et al. 2005). Les répétitions de guanosines pouvant former des structures secondaires d'ARN solides de forme tige-boucle appelées G-quadruplexes, on peut concevoir qu'une façon par laquelle entre autres hnRNP F régule l'épissage alternatif de Bcl-x est au travers de la prévention de la formation de ces structures hypothétiques dans la région B2G étant donné que les motifs qRRMs de cette protéine ont la capacité d'annuler ce repliement de l'ARN et que l'utilisation individuelle des domaines qRRM 1 et 3 dans des essais d'épissage *in vitro* promeut l'utilisation d'épissage xS (Dominguez et al. 2010). hnRNP F et H sont aussi les médiateurs de l'impact anti-apoptotique de TSA, un inhibiteur de déacétylases d'histone qui accroît la stabilité des deux facteurs d'épissage en maintenant l'acétylation de certains résidus lysines clés (Koumbadinga et al. 2015). Une autre structure secondaire, cette fois-ci une tige boucle de 27 nt située dans le premier deux tiers de l'élément exonique E3b de 105 nt (au sein de l'exon 3), régule l'épissage alternatif de Bcl-x étant donné que sa délétion ou substitution par mutagénèse accroît l'utilisation du site xL (Lee et al. 2012).

Le grand élément B3 de 86 nt, dont l'extrémité 3' est située 11 nt en amont du site d'épissage xL, a initialement été isolé comme étant un activateur de l'utilisation de ce site d'épissage (Garneau et al. 2005). Celui-ci fut rescindé en quatre sous-régions de tailles quasi identiques et aux effets opposés sur la régulation de l'épissage de Bcl-x. Ainsi, par des essais de mutagénèse (délétion), il a été découvert que le premier quart de l'élément B3

(région AM1) promeut l'utilisation du site xS alors que le deuxième quart (région AM2) et le dernier quart (région ML2) favorisent la production de l'isoforme xL. Les régions AM2 et ML2 sont liées par la protéine SRSF9, plus précisément au niveau de la séquence AGGAG dans le cas de la région ML2. Ainsi, l'altération de l'intégrité de ces régions clés par mutations de transversion ou délétion abolit l'impact anti-apoptotique de la surexpression de SRSF9 dans les cellules HeLa et ECR-293, activité auparavant observée dans des essais d'épissage *in vitro* (Garneau et al. 2005; Cloutier et al. 2008). La réduction du niveau de la protéine cible par ARNi n'ayant pas d'impact sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x, une implication de SRSF9 est peut-être limitée aux situations où celle-ci est surexprimée. Au niveau de la région pro-apoptotique AM1, l'utilisation de deux sites d'épissage 5' cryptiques contigus (CAG/GUAUUG/GUGAGU) par U1 snRNP diminue la production de l'isoforme xL (Cloutier et al. 2008).

La délétion de l'élément B1AU, région de 82 nt dont l'extrémité 3' est située 10 nt en amont du site xS, a permis d'étiqueter cet élément comme un activateur global de l'utilisation du site apoptotique. Des essais de mutagenèse où l'élément est disséqué par une série de substitutions de dinucléotides ont permis d'isoler deux régions contrastées au sein de l'élément : une région activatrice de 46 nt en 5', suivi d'une région inhibitrice de 36 nt en 3' (contenue dans le sous-élément B1) pour le site xS. La présence de trois sites potentiels de liaison pour la protéine hnRNP K répartis sur 25 nt au sein de cet sous-élément B1 permet à ce facteur protéique souvent surexprimé dans les tissus cancéreux de diminuer la production de l'isoforme pro-apoptotique, tel que démontré par ARNi dans les cellules PC3 et MDA-MB-231 (adénocarcinome humain du sein), possiblement au interférant avec l'activité de la région activatrice située en amont (Pino et al. 2003; Revil et al. 2009; Michelle et al. 2012). Dans les cellules HEK 293 et des lignées HNSCC (carcinome épidermoïde du cou et de la tête), l'inhibition de PP2A par la protéine SET défavorise la sélection du site xS via une régulation positive de l'expression d'hnRNP K et de la phosphorylation de ses résidus thréonines (Neviani et al. 2005; Almeida et al. 2014). RBM25, dont la déplétion par shRNA dans les cellules HeLa entraîne une diminution de l'utilisation du site d'épissage pro-apoptotique, se lie à la séquence CGGGCA situé 64 à 69 nt en amont du site d'épissage xS et au cœur de la région B1AG (portion 5' de l'élément

B1AU) (Zhou et al. 2008; Revil et al. 2009). RBM25 faciliterait le recrutement et stabiliserait la liaison d'U1 snRNP au faible site pro-apoptotique au travers d'une interaction avec hLuc7A, protéine connue comme s'associant à la fois à une composante du complexe U1 snRNP (protéine U1-A) et à U1 snRNA, (Puig et al. 2007; Zhou et al. 2008).

L'étude de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x a permis l'attribution de nouvelles fonctions à plusieurs membres de l'EJC. La déplétion par ARNi, dans les cellules HeLa et ECR-293, des protéines du cœur (core) de l'EJC Y14 et eIF4A3, ainsi que des protéines auxiliaires RNPS1, Acinus et SAP18 augmente la production de l'isoforme pro-apoptotique de Bcl-x (Michelle et al. 2012). Un rôle comme facteur d'épissage avait déjà été démontré dans le cas des trois protéines auxiliaires qui forment le complexe ASAP (*apoptosis and splicing associated protein*) (Schwerk et al. 2003). Récemment, il a été montré que, au contraire, la surexpression d'Acinus dans les cellules 293A (sous-clone de la lignée 293) accroît l'utilisation du site faible xS (Wang et al. 2015). Puisque la surexpression, en changeant la stœchiométrie et le rapport des composantes d'un complexe régulateur, peut entraîner la séquestration de facteurs protéiques, l'impact sur la régulation de l'épissage alternatif peut être similaire à celui obtenu par déplétion et ainsi expliquer la présente situation avec Acinus. Des essais de mutagenèse ont permis d'isoler une première région responsable de l'effet de RNPS1 sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x, soit un petit segment de 10 nt (région 17) située au cœur de l'élément SB1 et 285 à 275 nt en amont du site xS, et une seconde responsable de l'effet des protéines Y14 et eIF4A3, soit la région de 26 nt B2E au sein de l'élément B2 et dont l'extrémité 5' est située 41 nt en aval du site pro-apoptotique (Michelle et al. 2012). Cette disposition des régions régulatrices de part et d'autre du site d'épissage 5' de xS pourrait suggérer une régulation par un mécanisme de looping-out qui séquestrerait, via interactions entre les membres de l'EJC, le site pro-apoptotique. Le NMD, dont l'EJC est une composante essentielle, pouvant altérer le ratio des isoformes produites par le contrôle de la demi-vie des ARNm, plusieurs faits soutiennent un rôle authentique indépendant du NMD et hors de la fonction habituelle de l'EJC pour ces protéines dans la régulation de l'épissage alternatif: pas de PTC chez Bcl-x, non implication des autres composantes de l'EJC et de l'export, régions de liaison

distinctes et séparées (éléments SB1 et B2), association au pré-ARNm et non au transcrit mature de Bcl-x (Michelle et al. 2012).

SF3B1, anciennement connu sous le nom de SAP155, est un autre facteur protéique qui régule l'épissage alternatif de Bcl-x; sa déplétion par ARNi dans les cellules A549 (cancer bronchique non à petites cellules) accroît la production de l'isoforme xS (Massiello et al. 2006; Shultz et al. 2012). L'action anti-apoptotique de SF3B1 est médiée au travers de sa liaison à l'élément CRCE1 (*ceramide-responsive RNA cis-element 1*), un élément riche en purines de 20 nt situé 277 à 295 nt en amont de l'intron 2 et qui, comme son nom l'indique, est l'une des régions du pré-ARNm de Bcl-x par lesquelles sont véhiculées l'action pro-apoptotique de la céramide, l'autre étant la région CRCE2 riche en pyrimidines de 15 nt située 127 à 140 nt en amont de l'intron 2 (Massiello et al. 2004; Massiello et al. 2006). L'impact de la région CRCE2 sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x fut confirmé dans les cellules HeLa où la délétion de la région B2.2 de l'élément B2 (qui contient CRCE2) diminue la production de l'isoforme xS (Garneau et al. 2005). La production endogène de céramide stimulée entre autres par la gemcitabine entraîne l'activation de deux familles de phosphatases sérines/thréonines, mais dont uniquement celle de la phosphatase PP1 a un impact sur l'épissage de Bcl-x (Chalfant et al. 1999; Chalfant et al. 2001; Chalfant et al. 2002). Cette phosphatase constitue un point de convergence de plusieurs cascades de signalisation régulant l'épissage alternatif de Bcl-x et initiées par de nombreux métabolites ou drogues. Dans de nombreuses lignées cellulaires, le 5'-methylthioadenosine (un métabolite du S-adenosylmethionine), l'agent diurétique amiloride et l'action synergique de l'antioxydant gallate d'épigallocatechine (EGCG) et de l'anti-inflammatoire non stéroïdien ibuprofène stimulent tout l'accroissement de l'utilisation du site xS en induisant l'expression ou l'activité de la phosphatase PP1 (Yang et al. 2004; Boon-Unge et al. 2007; Kim 2008; Chang et al. 2011; Chang et al. 2011). SF3B1 est l'un des effecteurs par lequel est modulé l'impact de la céramide sur l'épissage alternatif de Bcl-x puisque l'utilisation d'ARNi contre ce facteur en abolit son action (Massiello et al. 2006). De plus, il a été démontré que SF3B1 interagit avec PP1 via l'intermédiaire de NIPP1, entraînant ainsi sa déphosphorylation et une altération de son activité en faveur de la promotion de l'utilisation du site xS (Tanuma et al. 2008). SF3B1

est aussi le médiateur clé de diverses voies de signalisation dans la modulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. Ainsi, dans les cellules A549, l'action anti-apoptotique de la voie PI3 kinase (phosphoinositide 3) est médié au travers de la régulation de la production du facteur protéique, car l'utilisation d'inhibiteur contre PI3K entraîne une réduction de l'expression de SF3B1 et par conséquent, une diminution de la formation du complexe SF3B1-CRCE1 (Shultz et al. 2012).

Le traitement des cellules de rat OP (progénitrices d'oligodendrocytes) avec de la céramide exogène ou l'induction d'hypoxie/ischémie au niveau du système nerveux central du rat entraîne une production accrue de l'isoforme Bcl-xS par la redistribution intracellulaire (diminution de la présence nucléaire) de la protéine CUGBP1 suite à l'inhibition de la liaison de cette protéine à une région intronique de 22 nt riche en UG (située entre 17 et 38 nt du site xL) (Xiao et al. 2012). Le facteur de transcription E2F1, dont l'expression est accrue par l'utilisation d'agents alkylants (methylmethanesulfonate et cyclophosphamide), favorise la production de l'isoforme Bcl-xS au travers d'un accroissement de l'expression du facteur d'épissage SRSF2 (Merdzhanova et al. 2008). RBM10 (ou S1-1) favorise la production de l'isoforme pro-apoptotique, car sa déplétion dans les lignées cancéreuses HLE (hépatome) et HeLa diminue l'utilisation du site xS. RBM10 utilise son domaine RanBP2 de type doigt de zinc pour lier possiblement la séquence GG/GUAAG qui incluse dans le site d'épissage xL, bloquant stériquement par conséquent son accessibilité à la machinerie du spliceosome et favorisant ainsi la sélection du site pro-apoptotique xS (Inoue et al. 2014).

L'épissage alternatif de Bcl-x peut aussi être modulé par des effecteurs lipidiques. Ainsi, l'utilisation d'ARNi ou d'inhibiteur ((S)-BEL) contre la phospholipase iPLA₂β empêche le changement du ratio en faveur de l'isoforme Bcl-xS induit par le stress du réticulum endoplasmique (mauvais repliement de protéines) dans les cellules pancréatiques de l'îlot β. Dans le contexte présent, la promotion de l'utilisation du site xS par l'action de la phospholipase est majoritairement indépendante de la céramide et est plutôt modulée par la modification du profil lipidique des cellules de l'îlot β via entre autres une diminution de la production de 5-HETE (acide 5-hydroxytétraénoïque) (Barbour et al. 2015). Des essais de

délétion ont permis d'isoler 2 régions introniques (ISI) au travers desquelles sont médiées la répression de l'utilisation du site anti-apoptotique xL par interleukine-6 ou IL-6 (région située 77 à 176 nt en aval du site d'épissage xL) et le GM-CSF (région située 177 à 284 nt en aval du site d'épissage xL) dans les cellules K562 (Li et al. 2004). L'activation de l'interleukine-1 alpha (IL-1 α) découle du clivage d'un précurseur de 33 kDa en deux fragments de 16 kDa (segment N-terminal) et 17 kDa (segment C-terminal) par la calpaïne. Le fragment ainsi libre de 16 kDa d'IL-1 α peut dans diverses cellules cancéreuses (mais pas au niveau des cellules non transformées) promouvoir l'utilisation du site xS au travers de sa liaison à diverses protéines impliquées dans la maturation des ARNm tels que SRSF1 (Pollock et al. 2003). Au cours des années, plusieurs voies de signalisation ou drogues ont été découvertes comme influençant la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x, mais dont les effecteurs intervenant directement au niveau du pré-ARNm demeurent pour l'instant inconnus. Ainsi, la voie de la kinase Akt suite à la SUMOylation de ses résidus lysines dans les cellules HEK 293T et NF- κ B dans les granulocytes et lymphocytes matures quiescents favorisent l'utilisation du site xL (Bureau et al. 2002; Risso et al. 2013). Au contraire, l'inhibiteur de tyrosine kinase imatinib dans les cellules K562, l'inhibiteur d'histone déacétylases SAHA (qui accroît aussi l'expression de Fas et FasL) dans les cellules Huh-6 et HepG2, l'influx de Ca²⁺ extracellulaire (suite à la production de dérivés réactifs de l'oxygène stimulés par le 2,5-Hexanedione) dans les cellules spermatogéniques de rat, l'emploi d'anthracyclines (daunorubicine) ou l'inactivation de l'axe neureguline/erbB2-4 (ligand/récepteurs) par une diminution de l'expression des récepteurs ou de leur phosphorylation activatrice dans les cardiomyocytes de rat et l'impact de l'utilisation d'amphétamines dans les cellules neuronales de rat favorisent tous l'utilisation du site xS (Stumm et al. 1999; Rohrbach et al. 2005; Rohrbach et al. 2005; Mishra et al. 2006; Emanuele et al. 2007; Liu et al. 2012).

Quelques études récentes ont permis d'ajouter Bcl-x à la liste des exemples illustrant le couplage entre contrôle de la transcription et régulation de l'épissage alternatif. Au sein de l'élément SB1 qui constitue la première moitié de l'exon 2 (361 nt) se trouve une région de 10 nt riche en guanosines-cytidines, située environ 230 nt en amont du site xS (région 23). Cette région génère par la formation d'une structure tige-boucle un site de pause pour

l'ARN pol II, tel que démontré par des expériences de séquençage ChIP-Seq. L'élimination de ce site de pause par délétion réduit grandement la production de l'isoforme anti-apoptotique, premier indice d'un lien entre le contrôle de l'élongation et la régulation de la sélection des sites d'épissage 5' de Bcl-x (Montes et al. 2012). TCERG1 (*transcription elongation regulator 1*), anciennement connu sous le nom de CA150, est un facteur protéique impliqué dans la régulation de l'élongation de la transcription et de l'épissage alternatif de certains pré-ARNm tels CD44 (Pearson et al. 2008). La surexpression de TCERG1 dans les cellules HEK 293T, au travers d'une liaison directe au site de pause qui entraîne par conséquent une diminution de l'accumulation de la polymérase au niveau de l'élément SB1, génère un accroissement de l'utilisation du site xS. Cet impact de TCERG1 est dépendant du type de promoteur employé ainsi que d'une ARN pol II complète puisque l'utilisation d'un mutant délétère au niveau du domaine CTD abolit son activité sur Bcl-x. Ainsi, TCERG1, qui renverse l'activité anti-apoptotique d'une polymérase mutante lente, régule l'épissage alternatif de Bcl-x via la promotion de l'élongation transcriptionnelle au travers de laquelle le facteur préviendrait possiblement l'assemblage d'un complexe répressif pour le site xS au niveau de l'élément SB1 (Montes et al. 2012). En effet, la délétion de l'élément SB1 a démontré, tout d'abord dans des essais d'épissage *in vitro* (Garneau et al. 2005), puis lors de transfections de minigènes dans les cellules HeLa (Revil et al. 2007), que celui-ci agit globalement comme un inhibiteur de l'utilisation du site pro-apoptotique. Cet élément constitue le point de convergence de différentes voies de signalisation telles que celles de la protéine kinase C ou PKC découverte par l'entremise de l'utilisation de l'inhibiteur général de kinases staurosporine avec une haute affinité pour PKC (Ruegg and Burgess 1989; Revil et al. 2007) et de l'inhibiteur spécifique de la PKC calphostine C (Revil et al. 2007), et de la voie de réponse aux dommages à l'ADN ou DDR (*DNA damage response*) découverte par l'entremise de l'agent inducteur de dommages à l'ADN oxaliplatine (Shkreta et al. 2011; Shkreta et al. 2016). L'activation de la DDR ou l'inactivation de PKC entraînent toutes les deux un accroissement de la production de l'isoforme Bcl-xS dans les cellules ECR-293 ((Revil et al. 2007; Shkreta et al. 2011). Cet impact de l'inactivation de la kinase PKC n'est observé que dans la lignée non transformée ECR 293, possiblement dû au fait que cette voie est inactivée ou résistante aux inhibiteurs dans les cellules cancéreuses. Pour ce qui est de l'oxaliplatine, son impact sur l'épissage

alternatif de Bcl-x, de même que pour autre agent à cœur de platine (cisplatine), fut d'abord observé dans une étude portant sur l'impact d'une vingtaine de drogues anticancéreuses sur la régulation de l'épissage alternatif de gènes apoptotiques dans 6 lignées cellulaires cancéreuses et non transformées, avec des effets variables selon les lignées (Shkreta et al. 2008). Cet impact de l'oxaliplatine (et de la cisplatine) sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x est médié via l'activation de la DDR puisque l'inactivation par ARNi ou par des inhibiteurs de différents effecteurs de cette voie, soit les kinases ATM/ATR (caféine), la kinase CHK2 (CHK2 inhibitor II) et le facteur de transcription p53 (pifithrin- α), abolit l'accroissement de la production de l'isoforme pro-apoptotique. L'entrave à l'utilisation accrue du site xS par la staurosporine par l'inactivation de p53 ou l'abolition de l'impact de la staurosporine et de l'oxaliplatine par l'emploi de l'inhibiteur de tyrosines phosphatases orthovanadate soutient une convergence de ces deux voies. Au cœur de cette convergence entre les voies de signalisation de la DDR et de PKC pourrait se trouver la régulation de la phosphorylation de résidus tyrosines qui contrôlerait la dégradation d'un facteur trans protéique commun d'identité pour l'instant inconnue et de faible quantité dans les cellules ECR-293 (Shkreta et al. 2011). Il est important de noter que l'impact de l'oxaliplatine et de la cisplatine peut être indépendant de p53 dans certaines lignées cellulaires, soulignant l'existence de voies secondaires qui modulent l'effet de ces agents sur l'épissage de Bcl-x (Shkreta et al. 2008). De même, il a été découvert récemment que la voie de signalisation de la DDR pouvait moduler l'épissage alternatif de Bcl-x indépendamment de l'élément SB1 via en autres les régions B1U et B2G. Ces régions seraient capitales à la levée de la répression par SRSF10 et hnRNP F et H de l'utilisation du site xS en situation d'activation de la DDR. Nous traiterons plus en détail un peu plus loin dans la thèse du rôle et de l'importance de ces protéines dans la modulation de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x exercée par l'oxaliplatine (Shkreta et al. 2016).

Un autre indice de l'importance de la régulation de la vitesse de transcription sur la régulation de Bcl-x découle de l'impact de l'irradiation ultraviolette (plus précisément UVC) de cellules Hep3B (hépatome humain) et HCT116 (carcinome colorectal humain) en culture. Le rayonnement UV, inducteur de dommages à l'ADN, accroît l'utilisation du site xS non pas au travers de l'activation de la voie de la DDR, mais plutôt via une

hyperphosphorylation du CTD de l'ARN pol II, entraînant ainsi une inhibition de l'élongation transcriptionnelle (Munoz et al. 2009). Cinq promoteurs murins (-142, -655, -1886, -2721 et -3412 pb en amont du codon d'initiation de la traduction) et trois promoteurs humains (-134, -590 et -650 pb en amont du codon d'initiation de la traduction) ont jusqu'à présent été découverts pour l'initiation de la transcription du gène *Bcl-x* (Grillot et al. 1997; MacCarthy-Morrogh et al. 2000; Pecci et al. 2001). La nature distincte de ces différents promoteurs a le potentiel de réguler de manière spécifique l'épissage alternatif du pré-ARNm de *Bcl-x*. Chez la souris, l'épissage alternatif des pré-ARNm générés à partir des cinq différents promoteurs ne produira pas les mêmes isoformes dans les mêmes proportions. Alors que l'utilisation des promoteurs P1 et P3 entraîne la production quasi exclusive de l'isoforme *Bcl-xL* et *Bcl-x γ* respectivement, le promoteur P2 quant à lui génère dans diverses proportions les deux isoformes majeures, ainsi que l'isoforme mineure *Bcl-x γ* (Pecci et al. 2001). Chez la souris, la présence de deux éléments de liaison pour le récepteur aux glucocorticoïdes (hormones stéroïdiennes) situés en amont du promoteur P4 sensibilise l'activité de celui-ci à la présence des hormones (Viegas et al. 2004). Dans les cellules épithéliales murines mammaires et de l'endomètre, le traitement hormonal avec du dexaméthasone (un glucocorticoïde de synthèse) induit une transcription accrue de *Bcl-x*, à partir du promoteur P4, et une production augmentée de l'isoforme anti-apoptotique (Pecci et al. 1997; Viegas et al. 2004). Au contraire, dans les thymocytes et lymphocytes T murins, le traitement entraîne plutôt une répression de la transcription de *Bcl-x* et un accroissement de la production de l'isoforme courte pro-apoptotique (Vicent et al. 2002; Rocha-Viegas et al. 2006). La répression de l'activité du promoteur murin P4, et le changement d'épissage associé, dans ces dernières cellules découle du recrutement, par la liaison transitoire aux régions sensibles du récepteur aux glucocorticoïdes, d'une STAT5B phosphorylée (membre de la famille de facteurs de transcription STAT) et de l'histone déacétylase HDAC3 (compactant la chromatine). En effet, l'inhibition de la phosphorylation de STAT5B (sa forme active) par l'emploi d'inhibiteur de la kinase JAK abolit son recrutement et convertit la répression de la transcription par les glucocorticoïdes en activation (Rocha-Viegas et al. 2006). Dans les cellules humaines HepG2, l'impact pro-apoptotique de MTA et SAME ne se manifeste que sur les transcrits produits à partir des deuxièmes et troisièmes promoteurs (P2 et P3) (Yang et al. 2004).

Première problématique

Les travaux présentés dans cette thèse porteront dans un premier temps sur la caractérisation de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x par les voies de signalisation de PKC (staurosporine) et de la DDR (oxaliplatine) au travers de l'élément SB1. Outre pour un site de pause pour l'ARN polymérase II et une courte région médiant l'effet anti-apoptotique de la protéine accessoire de l'EJC RNPS1, peu est connu sur la régulation exercée par ce grand élément de 361 nt au niveau de la sélection des sites d'épissage 5' de Bcl-x. Notre hypothèse de travail est que la voie de signalisation de PKC et les stress génotoxiques influencent l'épissage alternatif du régulateur apoptotique Bcl-x en modulant l'activité de facteurs d'épissage liant différents sous-régions au sein de l'élément SB1.

Objectifs

Objectif #1

Caractérisation et isolation de sous-régions régulatrices pour l'épissage alternatif de Bcl-x présentes au sein de l'élément SB1.

Objectif #2

Identification des facteurs d'épissage liant ces sous-régions régulatrices et détermination de leur rôle dans la modulation de l'impact des voies de signalisation de la PKC et de la DDR sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x

Objectif #3

Déterminer si ce modèle de régulation de l'épissage alternatif par les voies de signalisation de PKC et de la DDR présent chez Bcl-x est partagé par d'autres pré-ARNm impliqués dans la régulation de l'apoptose, de la DDR et du cycle cellulaire.

Deuxième problématique

Dans un deuxième temps, les travaux de cette thèse porteront sur l'impact de l'instabilité génomique dans la régulation et l'évolution des profils d'épissage alternatif. L'intégralité nucléotidique des séquences régulatrices étant primordiale pour leur action, des mutations survenant dans des régions primordiales pour la régulation de l'épissage alternatif pourraient avoir un impact critique. Nous avons vu qu'un nouveau rôle comme gardien de

la stabilité du génome a été attribué aux facteurs d'épissage récemment puisque la déplétion de ceux-ci accroît la production de dommages à l'ADN. Le mécanisme menant à cette instabilité n'a pas été encore complètement élucidé, mais pourrait impliquer la formation de la structure hybride d'ARN-ADN qu'est le R-loop. Notre hypothèse de travail est que la formation de R-loops, au travers d'un défaut de couverture appropriée du pré-ARNm par les RBPs, pourraient entraîner des dommages à l'ADN préférentiellement dans des régions normalement liées par ces facteurs et impliquées dans le contrôle de l'épissage alternatif, que ce soit par exemple des sites de liaisons pour des facteurs d'épissage ou les sites d'épissage même situés à l'embranchement des exons et des introns. Ces altérations à l'intégrité génomique, si non réparées adéquatement et converties en dommages double brins, produiront des mutations qui seront perpétuées lors des prochains cycles de réplication. Lors de la transcription, les pré-ARNm mutés pourraient ainsi voir leur profil d'épissage altérés par rapport au pré-ARNm original.

Objectifs

Objectif #1

Détermination du taux d'altération permanente des profils d'épissage de cellules en culture

Objectif #2

Accentuation spécifique de cette altération permanente des profils d'épissage par la déplétion de facteurs d'épissage

Objectif #3

Vérification de l'implication de l'instabilité génomique dans l'accentuation de l'altération maintenue des profils d'épissage produite par la déplétion des facteurs d'épissage

Objectif #4

Vérification de l'implication des R-loops dans l'accentuation de l'altération maintenue des profils d'épissage produite par la déplétion des facteurs d'épissage

Au cours de ce doctorat, des travaux effectués en collaboration avec d'autres membres du laboratoire dans le cadre de l'étude de la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-x m'ont permis de contribuer à la production de trois articles scientifiques dont les résultats ne seront pas présentés dans cette thèse.

Revil, T., Pelletier, J., Toutant, J., **Cloutier, A.**, Chabot, B., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform.* J Biol Chem. **2009** Aug 7;284(32):21458-67.

Nous avons démontré dans ce premier article l'implication pro-apoptotique d'hnRNP K au travers de l'élément B1 dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x.

Montes, M., **Cloutier, A.**, Sánchez-Hernández, N., Michelle, L., Lemieux, B., Blanchette, M., Hernández-Munain, C., Chabot, B., Suñé, C., *TCERG1 regulates alternative splicing of the Bcl-x gene by modulating the rate of RNA polymerase II transcription.* Mol Cell Biol. **2012** Feb;32(4):751-62.

Les travaux présentés dans ce deuxième article ont mis en lumière un autre exemple du couplage transcription – épissage dans lequel la surexpression du facteur de transcription TCERG1 entraîne une diminution de l'accumulation anti-apoptotique de l'ARN pol II au niveau d'un site de pause situé au sein de l'élément SB1.

Michelle, L., **Cloutier, A.**, Toutant, J., Shkreta, L., Thibault, P., Durand, M., Garneau, D., Gendron, D., Lapointe, E., Couture, S., Le Hir, H., Klinck, R., Elela, SA., Prinos, P., Chabot, B., *Proteins associated with the exon junction complex also control the alternative splicing of apoptotic regulators.* Mol Cell Biol. **2012** Mar;32(5):954-67.

L'étude de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x a permis l'attribution de nouvelles fonctions à plusieurs membres de l'EJC. Les travaux présentés dans ce dernier article soutiennent un rôle authentique indépendant du NMD et différent de la fonction habituelle de l'EJC pour ces protéines dans la régulation de l'épissage alternatif.

CHAPITRE I - ARTICLE 1

hnRNP A1/A2 and Sam68 collaborate with SRSF10 to control the alternative splicing response to DNA damage

Auteurs de l'article: Alexandre Cloutier, Lulzim Shkreta, Johanne Toutant, Mathieu Durand, Philippe Thibault et Benoit Chabot

Statut de l'article: Article soumis (Scientific Reports, numéro de référence: SREP-17-22408-T)

Avant-propos: Cet article est le produit d'une combinaison de travaux effectués par notre associé de recherche, M. Lulzim Shkreta (Ph.D.), et moi-même où, par deux approches différentes utilisant le même élément, nous avons pu isolé différentes composantes d'un complexe régulateur important pour le contrôle de l'épissage alternatif de Bcl-x en situation de stress. J'ai effectué expérimentalement la mutagenèse exhaustive de l'élément qui nous a permis d'obtenir l'information requise à nos essais de chromatographie d'affinité à l'ARN (Fig. 1B et 1C). Ma contribution expérimentale s'est concentrée par la suite au niveau des travaux et résultats impliquant les protéines hnRNP A1/A2 et Sam68. Ainsi, j'ai isolé ces protéines par chromatographie d'affinité (Fig. S2F et S2G) et déterminé leur contribution dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x (Fig. 3A et 3C). J'ai par la suite vérifié l'importance de ces protéines dans la régulation de l'épissage alternatif d'événements impliqués dans le devenir de la cellule (apoptose, cycle cellulaire, DDR) avec une première série d'unités qui fut par la suite accrue et amalgamée par M. Shkreta (Fig. 5, S3 et S4, Table S2 et S3). Finalement, j'ai effectué des essais préliminaires d'immunoprécipitations d'ARN à l'aide d'anticorps ciblant ces protéines qui furent complétés par M. Shkreta (Fig. 3F et Table S1). Au niveau de la rédaction, j'estime ma contribution à 40% du total présenté, soit les parties qui concernent les protéines que j'ai isolées au niveau des résultats et de la discussion, en plus de l'établissement du modèle de complexe régulateur et de son implication dans un réseau concerté de régulation d'événements d'épissage alternatif.

Résumé:

Cet article enrichit nos connaissances par rapport à des aspects encore sous-étudiés de la régulation de l'épissage alternatif, à savoir la contribution combinatoire de plusieurs protéines liant l'ARN (RBPs) dans la régulation de l'épissage alternatif d'événements spécifiques et comment ces associations régulatrices sont remodelées par les différents stress environnementaux qui affligent nos cellules. Nos résultats indiquent que les dommages à l'ADN reconfigurent l'activité et la liaison de plusieurs RBPs régulatrices sur le pré-ARNm de Bcl-x. L'une des séquences régulatrices clés est l'élément SB1. Des travaux précédents effectués dans notre laboratoire ont montré que cette région de 361 nucléotides agit globalement comme un répresseur de l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl-xS et constitue un point de convergence de la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC) et de la cascade de détection des dommages à l'ADN (DDR) au travers de phosphatases de tyrosines induites par p53. La dissection de ce vaste élément a permis l'isolation et la caractérisation de sous-régions régulatrices. Avec cette information, deux essais de chromatographies d'ARN utilisant l'entièreté ou la sous-région centrale répressive de SB1 comme cible ont permis de récupérer la protéine 14-3-3 ϵ (partenaire d'interaction de SRSF10) et protéine hnRNP A1 (partenaire d'interaction de Sam68). Alors que SRSF10, 14-3-3 ϵ , hnRNP A1/A2 et Sam68 ne participent que faiblement à la régulation de l'épissage alternatif, celles-ci constituent des joueurs clés de la levée de la répression de l'utilisation du site xS suite à l'induction de dommages à l'ADN (un rôle démontré précédemment pour SRSF10). Cette atteinte à l'intégrité nucléotidique par l'utilisation d'oxaliplatine entraîne un remodelage dynamique des interactions protéiques entre les RBPs repêchées (l'oxaliplatine entraîne une perte de l'association de SRSF10 avec les protéines 14-3-3 ϵ et hnRNP A1) et de leur liaison au pré-ARNm de Bcl-x (l'oxaliplatine accroît cette liaison pour les protéines Sam68 et hnRNP A1/A2 et réduit celle de SRSF10 au travers d'une possible altération de leur phosphorylation), permettant le départ de répresseurs (RNPS1 et hnRNP K) et l'arrivée de stimulateurs (hnRNP F/H). En étendant notre analyse à d'autres pré-ARNm clés associés à la DDR, on a constaté que SRSF10, hnRNP A1/A2 et Sam68 font partie d'un complexe commun central qui coordonne la régulation de l'épissage alternatif de plusieurs transcrits impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN en réponse à l'induction de stress génotoxiques. Ainsi, nous avons révélé que l'activité des facteurs d'épissage est reconfigurée dans le but de produire des associations permettant une coordination entre divers processus cruciaux à la survie de la cellule.

hnRNP A1/A2 and Sam68 collaborate with SRSF10 to control the alternative splicing response to DNA damage

**ALEXANDRE CLOUTIER[#], LULZIM SHKRETA[#], JOHANNE TOUTANT, MATHIEU
DURAND¹, PHILIPPE THIBAUT¹ AND BENOIT CHABOT***

*Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty de Medicine and Health Sciences,
and ¹RNomics Platform of the Université de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Quebec, Canada J1E 4K8*

[#] *these authors contributed equally*

* Corresponding author: benoit.chabot@usherbrooke.ca

ABSTRACT

Little is known about how RNA binding proteins cooperate to control splicing, and how stress pathways reconfigure these assemblies to alter splice site selection. We have shown previously that SRSF10 plays an important role in the *Bcl-x* splicing response to DNA damage elicited by oxaliplatin in 293 cells. Here, RNA affinity assays using a portion of the *Bcl-x* transcript required for this response led to the recovery of the SRSF10-interacting protein 14-3-3 ϵ and the Sam68-interacting protein hnRNP A1. Although SRSF10, 14-3-3 ϵ , hnRNP A1/A2 and Sam68 do not make major contributions to the regulation of *Bcl-x* splicing under normal growth conditions, upon DNA damage they become important to activate the 5' splice site of pro-apoptotic Bcl-xS. Our results indicate that DNA damage reconfigures the binding and activity of regulatory RNA binding proteins on the *Bcl-x* pre-mRNA. Moreover, SRSF10, hnRNP A1/A2 and Sam68 collaborate to drive the DNA damage-induced splicing response of several transcripts that produce components implicated in apoptosis, cell-cycle control and DNA repair. Our study reveals how the circuitry of splicing factors is rewired to produce partnerships that coordinate alternative splicing across processes crucial for cell fate.

INTRODUCTION

Alternative splicing generates proteomic diversity that drives biological complexity. Splicing decisions that lead to the production of variants are regulated by RNA binding proteins (RBPs) that interacts splicing enhancer and silencer elements usually located close to the regulated splice site ¹, but that can also be found at some distance to be brought in closer proximity by RNA looping ². Specific RBPs can display enhancer or silencer activity depending on where they bind on a pre-mRNA and may collaborate, synergize or antagonize with neighboring RBPs ¹. Documenting the combinatorial contribution of several RBPs in the regulation of a specific splicing decision remains an understudied question in splicing control, and only a few model systems have been used to explore this complexity (e.g. *Bcl-x*, *c-src*, *CD45* and *Fas* ^{3,4,5,6}). Another emerging but still poorly understood area concerns how the interactions between regulatory RBPs are restructured following physiological cues and environmental stresses such as DNA damage. On this theme, recent studies have identified co-transcriptional splicing events that are disrupted by DNA damage (reviewed in ^{7,8}). For example, different types of DNA damaging agents impact the co-transcriptional splicing activity of EWS on transcripts encoding apoptosis and DNA repair components ^{9,10}. DNA damage also favors the assembly of a complex between BRCA1 and splicing factors at DNA repair genes that stimulates splicing ¹¹.

We have selected the *Bcl-x* gene (aka *BCL2L1*) to study how multiple RBPs converge to regulate a simple splicing decision that involves two competing 5' splice site (5'ss) producing the pro-apoptotic Bcl-xS and the anti-apoptotic Bcl-xL splice variants. *Bcl-x* also provides an ideal system to study how DNA damage remodels splicing regulation to encourage the

production of a pro-apoptotic splice variant. A large number of RBPs have been implicated in the homeostatic regulation of *Bcl-x* splicing³: these include the SR proteins SRSF1^{12, 13, 14, 15}, SRSF2¹⁶, SRSF3¹⁷, SRSF7¹⁷, SRSF9¹³ and SRSF10¹⁸, the hnRNP proteins A1¹², PTBP1¹⁷, K¹⁹ and F/H^{20, 21}, the RNA binding proteins Sam68¹², SF3B1²², RBM4²³, RBM11²⁴, RBM25²⁵, RBM10²⁶, TRA2 β ¹⁷, the exon-junction components RNPS1, Acinus, SAP18 and eIF4A3/Y14²⁷, as well as the transcription factors TCERG1²⁸ and FBI-1^{28, 29}. In addition, several kinases and signalling pathways converge to regulate *Bcl-x* splicing, including the tyrosine kinase FYN1 that phosphorylates Sam68¹², the aurora kinase A that affects SRSF1 phosphorylation¹⁴, the phosphatase 2A inhibitor protein SET that interacts with hnRNP K to stimulate its repressor activity³⁰, the PP1 phosphatase that targets SF3B1 and SRSF10^{22, 31}, and more than a dozen other kinases and phosphatases for which we know little about their target RBPs^{14, 32, 33, 34}.

One interesting feature uncovered about homeostatic *Bcl-x* splicing regulation is the role of PKC in enforcing repression of the 5'ss of Bcl-xS, and the loss of this repression following activation of the DNA damage response (DDR) using platinum agents^{33, 35}. Notably, the impact of both PKC inhibition and oxaliplatin on *Bcl-x* splicing require the SB1 element, a 361 nt-long ill-defined region located approximately 150 nt upstream of the 5'ss of Bcl-xS. The only regulatory factors that have been associated with this region are RNPS1, whose repressive activity on the Bcl-xS 5'ss requires a small 10 nt-long region in the central portion of SB1²⁷, and TCERG1, which relieves a transcription pausing site in the downstream portion of the element important for repression of the Bcl-xS 5'ss²⁸.

To gain further insight into the contribution of SB1 to *Bcl-x* splicing control, we carried out a mutational analysis of the SB1 element, and used affinity chromatography to recover the 14-3-3 ϵ and the hnRNP A1/A2 proteins. 14-3-3 ϵ is known to interact with SRSF10³¹, while

hnRNP A1/A2 collaborates with Sam68 to control *Bcl-x* splicing¹². Interestingly, we find that the contributions of 14-3-3 ϵ , hnRNP A1/A2 and Sam68 are most apparent following DNA damage when they become important to activate the 5'ss of pro-apoptotic Bcl-xS. By extending our analysis to other transcripts associated with the DDR, we report that the combinatorial contribution of hnRNP A1/A2, Sam68 and SRSF10 to alternative splicing of DDR-relevant transcripts is broadly reconfigured after DNA damage, allowing coordinated splicing decisions to control the production of components that orchestrate the cellular response to DNA damage.

RESULTS

Dissecting the SB1 element

The 361-nucleotide (nt)-long element SB1 begins approximately 150 nt upstream of the Bcl-xS 5'ss (Fig. 1A) and behaves globally as a silencer for this 5'ss³³. We have shown previously that a 10-nt portion of SB1 (dubbed region 18 or Reg18) is required for RNPS1 to act as a repressor²⁷. We also identified a RNA polymerase II (RNAPII) pausing site within SB1 (Reg23) that represses the use of the Bcl-xS, and is relieved by the elongation and splicing-related factor TCERG1²⁸. To investigate in more details the contribution of other portions of SB1, we produced an extensive set of substitutions mutants that we tested in ECR293 cells. Essentially, a transversion mutant was made for each consecutive 10-nt segment along the length of a 310-nt portion of SB1, producing 31 subregions (Fig. 1B, Supplementary Fig. S1). For several transversion mutants displaying an effect, we tested the impact of a simple 10-nt deletion mutant and of another 10-nt randomly selected substitution mutant carrying the sequence GACTCAGTGT.

Fifteen of the 31 transversion mutants identified non-contiguous regulatory regions (Fig. 1B). Testing deletion mutants for each of the 10-nt segment confirmed several regulatory regions, identified a new one (Reg15) and yielded two mutants shifting in the direction opposite than what was observed with the first set of substitutions (Reg9 and 11). The different impact of transversion and deletion mutants may be expected since each transversion creates a new sequence with some that may affect splicing. In all cases tested, the GACTCAGTGT substitution mutants confirmed the impact of the deletion mutants. Using a threshold for splicing change of 10 percentage points with the deletion mutants, we present a refined splicing control map for SB1 with a central 110 nt-long silencer region (Reg9-19) interrupted by a weak enhancer (Reg12) (Fig. 1B). This core silencer is flanked on either side by two silencer elements (Reg2 and Reg23), and two downstream enhancer elements (Reg28 and Reg30). Inserting Reg9-19 in the Δ SB1 minigene at a site that respects its natural distance to the Bcl-xS 5'ss imposed repression of the Bcl-xS 5'ss (Fig. 1C).

14-3-3 ϵ and hnRNP A1/A2 associate with SB1

To identify factors that associate with the SB1 element, we employed two chromatographic strategies. First, we stably co-expressed in 293 cells the MS2-TAP protein and the SB1 element tagged with 10 repeats of the MS2 binding site (Supplementary Fig. S2A). A mutated version of this element (SB1 Δ 3) that harbors deletions of segments Reg11, Reg17 and Reg23 was used as a control. Individually or in combination, these deletions abrogate the SB1-mediated splicing repression (Supplementary Fig. S2B). Total RNA from stable ECR293 clones was tested by RT-PCR for expression of SB1-MS2 or SB1 Δ 3-MS2 (Supplementary Fig. S2C). Expression of the MS2-TAP was confirmed by immunoblotting (Supplementary Fig. S2D). Relying on the MS2-TAP protein, we then carried out tandem affinity purification to capture transcripts containing

MS2 binding sites and bound proteins. Pilot experiments indicated that the MS2 protein and SB1 transcripts were efficiently recovered by this procedure. A silver-stained gel displaying recovered proteins revealed a band at about 29 kDa in the SB1-MS2 but not in SB1Δ3-MS2-derived complexes (Supplementary Fig. S2E). The band was cut out and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). Mascot-based analysis of acquired LC-MS/MS data revealed the peptide KEAAENSLUAYKA as a partial sequence (amino acids 142-154) of the 14-3-3ε protein (confidence level: peptide ≥95% and protein ≥99%).

In parallel, we conducted RNA affinity chromatography using SB1 transcripts and HeLa nuclear extracts (Supplementary Fig. S2F). In this case, we used the central repressive region and its immediate neighboring subregions, the 130 nt-long Reg8-20. As a control for binding specificity, we used a 154 nt-long transcript made of multiple cloning sites from pCDNA3.1+. The RNA was covalently linked to adipic acid dihydrazide agarose beads to which was added the extract. Proteins were then eluted with increasing concentrations of NaCl. The 200 nM NaCl eluate revealed a silver-stained band of about 35-36 kDa appearing with the Reg8-20 RNA but not with the control transcript (Supplementary Fig. S2G). The band was cut out and analyzed by mass spectrometry to reveal multiple peptides belonging to various members of the hnRNP A/B family of proteins, with the most extensive protein coverage obtained with the hnRNP A1 and A2 proteins, respectively at 41% and 49%. The presence of four putative binding sites for hnRNP A1 and A2 within the target sequence (Supplementary Fig. S2H) supports the binding of these proteins to SB1.

14-3-3ε contributes to the Bcl-x splicing response to DNA damage

Because the recovery of 14-3-3ε required the presence of a region displaying silencer activity, we anticipated 14-3-3ε to repress the production of Bcl-xS. In contrast, overexpression of HA-

tagged 14-3-3 ϵ stimulated the production of Bcl-xS, and this stimulation was dependent on the presence of the SB1 element (Fig. 2A). The siRNA-mediated knockdown of 14-3-3 ϵ , or the expression of a difopein peptide (eYFP-D), a specific inhibitor of 14-3-3/ligand interaction³⁶, did not noticeably affect the splicing of *Bcl-x* transcripts expressed from a minigene (Fig. 2B and 2C) or endogenously produced *Bcl-x* (Fig. 2H). Given that the normal level of the Bcl-xS mRNA variant is relatively low, a drop may not be an easy event to promote and/or detect, especially since 14-3-3 ϵ is a member of a large family of proteins that may functionally compensate for the loss of 14-3-3 ϵ .

14-3-3 ϵ associates with SRSF10³¹, and SRSF10 also stimulates the production of Bcl-xS¹⁸. Thus, 14-3-3 ϵ may be important for the activity of SRSF10 on *Bcl-x* splicing. This hypothesis was validated by showing that the siRNA-mediated depletion of 14-3-3 ϵ compromised the SRSF10-mediated increase in Bcl-xS (Fig. 2D). A similar result was obtained with difopein (Fig. 2E). Our results are therefore consistent with the notion that 14-3-3 ϵ collaborates with SRSF10 to stimulate the 5'ss of Bcl-xS. To confirm the existence of an interaction between 14-3-3 ϵ and SRSF10, we co-expressed HA-14-3-3 ϵ and FLAG-SRSF10 in 293 cells, and carried out an immunoprecipitation with an anti-HA antibody in cellular extracts treated with RNase A. Immunoblot analysis of the recovered material revealed the presence of FLAG-SRSF10 in the complexes (Fig. 2F, lane 6). The converse immunoprecipitation with anti-FLAG antibodies recovered HA-14-3-3 ϵ (Fig. 2F, lane 10). SRSF10 acts through an element (B2G) bound by the hnRNP F/H proteins, which interact with SRSF10 and are required for SRSF10 activity¹⁸. The B2G element is required to detect the stimulatory effect of HA-14-3-3 ϵ (Fig. 2G). Overall, our results suggest that 14-3-3 ϵ is part of a stimulatory complex with SRSF10 and hnRNP F/H.

Oxaliplatin elicits a shift in splicing to the 5'ss of *Bcl-xS* that requires ATM/CHK2³⁵. SRSF10 is required for this oxaliplatin-induced splicing shift¹⁸. Oxaliplatin promotes the dissociation of SRSF10 and hnRNP K from hnRNP F/H and the *Bcl-x* pre-mRNA¹⁸. Notably, the siRNA-mediated depletion of 14-3-3 ϵ reduced the impact of oxaliplatin on the splicing of endogenous *Bcl-x* transcripts (Fig. 2H). Thus, whereas the depletion of 14-3-3 ϵ has little effect in normal growth conditions, 14-3-3 ϵ appears to play a more important role when the DNA damage response pathway is activated. SRSF10 becomes dephosphorylated when cells are treated with oxaliplatin, and this change is associated with a loss in the interaction of SRSF10 with hnRNP F/H proteins and the *Bcl-x* pre-mRNA¹⁸. Using cells that co-express FLAG-SRSF10 and HA-14-3-3 ϵ , we noted that oxaliplatin decreased the recovery of FLAG-SRSF10 with the anti-HA antibody (Fig. 2F, compare lane 8 with lane 6). Likewise, the recovery of HA-14-3-3 ϵ with the anti-FLAG antibody indicated a slight decrease (Fig. 2F, compare lane 12 with lane 10). The oxaliplatin-associated drop in interaction between 14-3-3 ϵ and SRSF10 is in line with the observation that another DNA damaging agent (e.g. UV) promotes the dissociation of 14-3-3 ϵ from SRSF10³⁷.

hnRNP A1/A2 and Sam68 are required for the *Bcl-x* splicing response to DNA damage

Although the depletion of hnRNP A1 by itself does not impact *Bcl-x* splicing, A1 is required for the activation of the 5'ss of *Bcl-xS* when Sam68 is overexpressed¹². The siRNA-mediated depletion of both hnRNP A1 and A2 from 293 cells also had no impact on endogenous and X2-derived *Bcl-x* splicing, and did not affect the stimulatory activity of HA-SRSF10 (Fig. 3A-B). The siRNA-mediated depletion of Sam68 also had little impact (Fig. 3C), similar to a previous study¹². We also tested whether the contribution of hnRNP A1/A2 and Sam68 when repression at the 5'ss of *Bcl-xS* was lifted by oxaliplatin. As shown in Fig. 3A and 3C, the siRNA-

mediated knockdown of A1/A2 or Sam68 compromised the oxaliplatin-induced shift in endogenous *Bcl-x* splicing, indicating that, upon DNA damage, hnRNP A1/A2 and Sam68 are co-opted to activate the 5'ss of Bcl-xS. As oxaliplatin promotes the dissociation of SRSF10 from the *Bcl-x* pre-mRNA and from hnRNP F/H but not hnRNP K¹⁸, we inquired about the interaction between SRSF10 and hnRNP A1. Immunoprecipitation assays indicated that hnRNP A1 interacts with SRSF10, but that this interaction was abrogated when cells were treated with oxaliplatin (Fig. 3D, compare lane 8 with lane 6). Given that 14-3-3 ϵ and hnRNP A1/A2 were found in association with SB1, we asked whether they interact with one another. Although the anti-A1 immunoprecipitation recovered FLAG-SRSF10, HA-14-3-3 ϵ was not detected (Fig. 3D). In contrast, immunoprecipitations carried out with the anti-HA antibody in cells expressing HA-14-3-3 ϵ recovered hnRNP A1/A2, and this interaction was maintained when cells were treated with oxaliplatin (Fig. 3E).

To address whether oxaliplatin affects the interaction of hnRNP A1 and Sam68 with the *Bcl-x* pre-mRNA, we used quantitative RT-PCR to measure the amount of *Bcl-x* RNA recovered by immunoprecipitation with antibodies against hnRNP A1 and Sam68. We used a reverse transcriptase primer and one PCR primer that mapped in the intron downstream of the Bcl-xL 5'ss to ensure that we monitored interactions with the pre-mRNA. The recovered material was treated with DNase I to eliminate the potential contribution of contaminating genomic DNA. As shown in Fig. 3F and Supplementary Table S1, treating cells with oxaliplatin increased the association of hnRNP A1 and Sam68 with the *Bcl-x* pre-mRNA, an impact similar to what we previously reported for hnRNP F and H¹⁸, and reproduced here.

Based on the above results, we propose the following update to our model of *Bcl-x* splicing regulation (Fig. 4). Under normal growth conditions, hnRNP K represses the 5'ss of Bcl-xS on a majority of transcripts by antagonizing the binding of hnRNP F/H whose role is to

render the 5'ss of Bcl-xS structurally available^{20, 21} (Fig. 4A). The upstream SB1 region also contributes to this repression, and RNPS1 is implicated in this activity²⁷. On a minor fraction of transcripts, a complex made up of SRSF10 and 14-3-3 ϵ would antagonize the function of hnRNP K and RNPS1 by recruiting or stabilizing the binding of hnRNP F/H to favor 5'ss recognition (Fig. 4B). hnRNP A1/A2, and possibly Sam68, may associate with this anti-repressor complex but their role would be minor. Oxaliplatin, by triggering the dissociation of 14-3-3 ϵ from SRSF10, would promote the dephosphorylation of SRSF10. Although its interaction with hnRNP K is not affected, the interaction of SRSF10 with hnRNP F/H and the *Bcl-x* pre-mRNA is reduced¹⁸ (Fig. 4C). A critical role for 14-3-3 ϵ after DNA damage may be through an interaction with other regulators including hnRNP A1/A2, and possibly Sam68. It is possible that oxaliplatin also changes the phosphorylation of hnRNP A1/A2, Sam68 and RNPS1 to alter their association with the SB1 element.

hnRNP A1/A2 and Sam68 cooperate with SRSF10 to control a broader program of splicing response to DNA damage

Given the role of hnRNP A1/A2 and Sam68 proteins in enforcing the production of the Bcl-xS pro-apoptotic splice variant in response to DNA damage, we inquired about the contribution of these RBPs in the control of other transcripts whose alternative splicing are also affected by DNA damage in 293 cells. First, we identified 37 alternative splicing events (ASEs) from apoptosis, DNA repair and cell-cycle genes that reacted to oxaliplatin with a splicing shift greater than 10 percentage points ($\Delta\text{PSI} > |10|$, P value < 0.05 ; Supplementary Tables S2 and S3, OXALI-CTRL column). Of these oxaliplatin-sensitive ASEs, 26 were sensitive to the depletion of hnRNP A1/A2 ($\Delta\text{PSI} > |5|$, P value < 0.05 ; Fig. 5B, 5C, Supplementary Fig. S3 and Supplementary Table S2). Seven of these 26 ASEs responded with a similar amplitude to the

A1/A2 depletion in oxaliplatin-treated and untreated cells (*SPTAN1*, *MAP2*, *POGZ*, *RCC1*, *LGALS9*, *CHEK1* and *MCL1*; labeled as *same* in Fig. 5C, Supplementary Fig. S3 and Supplementary Table S2); Four ASEs that were sensitive to the depletion of A1/A2 in untreated cells lost this reactivity in oxaliplatin-treated cells (*DOM3Z*, *CEP170*, *INCENP*, *KITLG*; labeled as *anti* in Fig. 5C, Supplementary Fig. S3 and Supplementary Table S2). Thirteen ASEs that were not affected by the depletion of A1/A2 in untreated cells became sensitive to it in oxaliplatin-treated cells (*BCL2L1*, *BRCA1*, *CASP8*, *CASP9*, *CHEK2*, *RBBP8*, *CDC25B*, *EXO1*, *KIF13A*, *PPP3CB*, *SDCCAG8*, *GPR137* and *GTF2H2*; labeled as *co-opt* in Fig. 5C, Supplementary Fig. S3 and Supplementary Table S2). *SLIT2* is also listed as a co-opted event because its sensitivity to the depletion of hnRNP A1/A2 was much greater in the presence of oxaliplatin (Δ PSI of 17 percentage points in normal conditions, and 53 in cells treated with oxaliplatin ; Supplementary Fig. S3A and Supplementary Table S2). *TNFRSF10B* displayed a shift in the opposite direction when A1/A2 were depleted in untreated cells compared to when treated with oxaliplatin (labeled as *reconf* in Fig. 5C and Supplementary Table S2).

In the case of Sam68, of the 38 oxaliplatin-sensitive ASEs, 26 were sensitive to its depletion (Δ PSI > |5|, *P* value <0.05; Fig. 5B, 5D, Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table S3). Six of these ASEs had a similar response to the depletion of Sam68 in oxaliplatin-treated and untreated cells (*CASP8*, *RBBP8*, *CDC25B*, *KITLG*, *PPP3CB*, and *ESYT2*; labeled as *same* in Fig. 5D, Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table S3). Seven ASEs that were sensitive to the depletion of Sam68 in untreated cells lost this reactivity in oxaliplatin-treated cells (*SPTAN1*, *CEP170*, *KIF13A*, *MAP2*, *MCL1*, *SLIT2* and *RP11*; labeled as *anti* in Fig. 5D, Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table S3). *INCENP* is also listed as *anti* because its sensitivity to the depletion of Sam68 was much greater in cells grown under normal conditions than with oxaliplatin (Δ PSI moving from 36 to 6 percentage points ; Supplementary Table S3).

Ten ASEs not affected by the depletion of Sam68 in untreated cells became sensitive to it in oxaliplatin-treated cells (*BCL2L1*, *BRCA1*, *CHEK2*, *DOM3Z*, *TNFRSF10B*, *EXO1*, *SDCCAG8*, *PCBP4*, *FANCA* and *TSSC4*; labeled as *co-opt* in Fig. 5D, Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table S3). Two ASEs (*CASP9* and *AURKB*) displayed shifts in the opposite direction when Sam68 was depleted in untreated cells compared to cells treated with oxaliplatin (labeled as *reconf* in Fig. 5D, Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table S3).

Notably, ~75% of the oxaliplatin-sensitive ASEs regulated by hnRNP A1/A2 were under Sam68 combinatorial control (Fig. 5B). Similar to *BCL2L1* (aka *Bcl-x*), the depletion of hnRNP A1/A2 and Sam68 both compromised the oxaliplatin-mediated shift in *BRCA1*, *CHEK2*, *CEP170*, *TNFRSF10B* and *INCENP*, suggesting additive or synergistic actions for A1/A2 and Sam68. In contrast, an antagonistic relationship between A1/A2 and Sam68 was noted for *CASP8*, *CASP9*, *RBBP8*, *SPTAN1*, *SDCCAG8*, *EXO1*, *MAP2* and *PPP3CB*. We previously identified 12 oxaliplatin-sensitive ASEs regulated by SRSF10¹⁸, and 9 of these ASEs were controlled by both hnRNP A1/A2 and Sam68 (Fig. 5B; Supplementary Figure S5 and Supplementary Table S4). Among these, an additive or synergistic action was noted for *BCL2L1*, *BRCA1*, *CHEK2* and *TNFRSF10B*. For 9 of these 12 ASEs, SRSF10 regulation occurred only in oxaliplatin-treated cells (indicated as *co-opt* in Supplementary Figure S5 and Supplementary Table S4). Thus, we have identified a multicomponent regulatory hub made up of SRSF10, hnRNP A1/A2 and Sam68 that coordinates the alternative splicing of several transcripts involved in cell-cycle control, apoptosis and DNA repair.

DISCUSSION

Combinatorial control of *Bcl-x* splicing

SB1 is a regulatory element that represses the 5'ss of *Bcl-x*S that is located at considerable

distance downstream. Using RNA-based affinity assays, we isolated 14-3-3 ϵ and hnRNP A1/A2 in association with SB1. These proteins turned out to play a positive role in the use of the *Bcl-xS* 5'ss, suggesting that they are part of an anti-repressor complex (Fig. 4). The stimulating activity of 14-3-3 ϵ is in line with the known interaction that 14-3-3 ϵ entertains with SRSF10, also a stimulator of the 5'ss of *Bcl-xS* ¹⁸. In normal growth conditions, SRSF10 interacts with hnRNP F/H on a minor subset of *Bcl-x* pre-mRNAs to offset repression imposed by hnRNP K, and RNPS1 bound to SB1 ^{19,27}. 14-3-3 ϵ , by protecting SRSF10 from dephosphorylation ³¹, may help consolidate this complex. Upon treatment with oxaliplatin, SRSF10 and hnRNP K abrogate their interaction with hnRNP F/H and their binding to the *Bcl-x* pre-mRNA ¹⁸ (Fig. 4). Oxaliplatin weakens the SRSF10/14-3-3 ϵ interaction, possibly leading to the dephosphorylation of SRSF10 and its dissociation from hnRNP F/H and the *Bcl-x* pre-mRNA. 14-3-3 ϵ remains important for the oxaliplatin-mediated *Bcl-x* splicing shift. Notably, hnRNP A1 interacts with 14-3-3 ϵ ³⁸ and this interaction is maintained in cells treated with oxaliplatin. Our results add to the already strong evidence documenting 14-3-3 proteins as preferential interactors with proteins involved in the DNA damage response ³⁹.

hnRNP A1 has been described as an activator of *Bcl-xS* because it collaborates with Sam68 to promote the use of the 5'ss of *Bcl-xS* ¹². Although hnRNP A1/A2 and Sam68 do not make substantial contribution to *Bcl-x* splicing in normal growth conditions, these proteins become critical for activating *Bcl-xS* when cells are treated with oxaliplatin. Moreover, their interaction with the *Bcl-x* pre-mRNA increases following DNA damage. Oxaliplatin may promote tyrosine dephosphorylation on Sam68 by counteracting the activity of the Fyn kinase, which is normally activated through PKC signaling ^{40,41,42}. A dephosphorylated Sam68 would then interact with hnRNP A1 and with the *Bcl-x* pre-mRNA to activate the 5'ss of *Bcl-xS* ¹². This model would explain why the *Bcl-x* splicing response to oxaliplatin requires activation of

tyrosine phosphatases³⁵. Finally, it is unclear what happens with the negative regulator RNPS1 after treatment with oxaliplatin. RNPS1 acts through SB1²⁷, and this interaction may be displaced by the DDR-induced binding of hnRNP A1/Sam68 (Fig. 4C).

Our model implies that the splicing response to DNA damage leads to a dynamic rewiring of the function of regulatory RBPs on the *Bcl-x* pre-mRNA. The minor anti-repressor function of SRSF10 becomes, following DNA damage, more important possibly through its interaction with the dissociated hnRNP K repressor, allowing hnRNP F/H to bind more productively. HnRNP A1/A2 and Sam68, which have a minor role in normal growth conditions, are, following DNA damage, co-opted to neutralize the repressor activity mediated by the SB1 element.

A network of DNA damage responsive alternative splicing events controlled by collaborating RBPs

Our study identified several RBPs involved in the *Bcl-x* splicing response to DNA damage. Because the splicing shift in *Bcl-x* favors the production of the pro-apoptotic variant, it was of interest to determine whether this response was coordinated with other transcripts encoding apoptotic regulators and factors involved in cell-cycle control and DNA repair. Our study reveals that nearly 25% (9 out of 37) of the alternative splicing events reacting to oxaliplatin were co-regulated by Sam68, hnRNP A1/A2 and SRSF10 (Fig. 5B). In addition, previous work has shown that hnRNP F/H proteins control at least four of these (*BCL2L1*, *BRCA1*, *CHEK2* and *TNFRSF10B*)¹⁸. This core of regulators therefore displays extensive connectivity to the three DDR-critical pathways that are apoptosis, cell-cycle control and DNA repair (Fig. 6). In addition to this all-inclusive hub, coordinated regulation between hnRNP A1/A2 and Sam68 was operative for 10 more co-regulated DNA damage-responding events (Fig. 5B). Sam68,

hnRNP A1/A2 and SRSF10 also regulated distinct events that often involved products entertaining functional interactions. For example, MLH3 (SRSF10) interacts with EXO1 (Sam68 and hnRNP A1/A2); AURKB (Sam68) interacts with CDC25B and INCENP (Sam68 and hnRNP A1/A2). The picture that emerges from this analysis is that splicing factors act in concert to shape the production of a collection of splice variants involved in cell fate. While in a few cases, the contribution of the regulator remains similar following DNA damage, in most cases, a change in activity occurs. This change either indicates co-opting, neutralization of function, or reconfiguration of activity, from repressor to activator or vice-versa. For some splicing units, splicing regulatory factors collaborate to elicit a splicing change in the same direction (e.g. *BCL2L1*, *BRCA1*, *CHEK2*, *TNFRSF10B*), but in other units they antagonize one another (e.g. *CASP9*, *RBBP8*).

Many of the alternative splicing events that are responsive to DNA damage and that are regulated by hnRNP A1/A2 and/or Sam68 are likely to be functionally significant. The alternative splicing of *CHEK2*, *CASP8*, *CASP9*, *TNFRSF10B*, *DOM3Z*, *MCL1*, *FANCA*, *AURKB*, *CHEK1*, *GTF2H2* all involve exons that alter the reading frame (Supplementary Table S5). Other events are producing variants with known differences in function. For example, the tyrosine phosphatase CDC25B is important for G2/M checkpoints and mitotic progression, and the variant whose production is encouraged by oxaliplatin displays dominant negative activity⁴³. In *KITLG*, Sam68 and hnRNP A1/A2 promote skipping of an exon that encodes a membrane-proximal extracellular protease cleavage site to yield the soluble form of KITLG rather than the membrane-associated variant^{44, 45}. In the DNA repair category, the DNA damage sensing protein *BRCA1* variant, whose production is stimulated by DNA damage and regulated by SRSF10, Sam68 and hnRNP A1/A2, lacks a linker region that separates the RING domain from a protein interaction platform. The hnRNP A1/A2-regulated alternative exon of GPR137 is also

predicted to encode a transmembrane helix according to Exon Ontology⁴⁶. As indicated in Figure 6, several splicing events responsive to DNA damage occur in components involved in intra- and cross-functional category interactions. For example, the DNA repair factor RBBP8 codes for an endonuclease that controls cell-cycle checkpoints and interacts with BRCA1 to regulate the activation of the CHK1 kinase. CHK2 interacts with CHK1, CDC25B and the DNA repair factors EXO1 and BRCA1. These interactions suggest that the coordinated splicing response to DNA damage may amplify the functional outcome across different categories.

Overall, our study documents combinatorial strategies that control the production of splice variants involved in DNA repair, cell-cycle control and apoptosis. Coordinated regulation may occur through larger assemblies of regulatory proteins (LASR), as recently described for RBFOX proteins forming multimeric complexes with hnRNP proteins⁴⁷. Our results suggest that the composition of such large complexes may be dynamic and may change upon DNA damage. The mechanism that rewires these activities during the DDR likely involves signaling. Oxaliplatin leads to the dephosphorylation of SRSF10 at residues that affect its activity and contribute to its interaction with other regulators¹⁸. Likewise, the oxaliplatin-mediated shift in *Bcl-x* splicing requires activation of tyrosine phosphatases whose target remain unclear³⁵, but may include Sam68, a protein that loses its ability to regulate *Bcl-x* splicing when phosphorylated by the tyrosine kinase FYN1¹². Future work will be important to determine how different stress pathways remodel distinct splicing regulatory complexes to modulate the production of functionally related group of effectors.

METHODS

Construction of *Bcl-x* mutants

X2 and Δ SB1 minigenes (inserted into SVEDA-HIV-2 vector) were constructed as described previously³⁵. The SB1 exhaustive mutagenesis transversion (changing A, G, C and T into T, C, G and A, respectively), deletion and linker (substitution of 10 nucleotides for GACTCAGTGT) mutants were produced by PCR site-directed mutagenesis, using the X2 minigene plasmid as template, the Pfu-turbo polymerase, and primers Human4 (ATGCCTGATCTCTGAAGCACAG) and PrHforw (TATAAATATACCCGCTCCGTGCA), with their associated mutation inserting primers. The derived PCR products were cleaved XhoI and KpnI and ligated into X2 minigene previously cut with the same enzymes. Δ SB1+Reg9-19 minigene was produced by PCR amplification using the X2 minigene plasmid as PCR template, the Pfu-turbo polymerase, and primers AscI-8-rev (AGCTCTGGCGCGCCGCTCAGTCCTGTTC) and AscI-25 (AGCTCTGGCGCGCCATGTCTCAGAGCAAC). The derived PCR product was cleaved AscI and ligated into Δ SB1 minigene previously cut with the same enzyme.

MS2-based chromatography assay

The SB1 fragment or SB1 Δ 3 derivative was tagged with ten repeats of the MS2 stem loop motif by PCR using the X2, X2-SB1 Δ 3 minigenes and pTLC1-MS2x10 plasmid (generous gift of R. Wellinger's laboratory) as templates and the following primers SB1-NheI-fwd (TTGCTAGCTAGGTCAGTCTCGAGCTT), SB1-MS2-rev (AATAATTTTTGGCATCCAACTGCTGCTGTG), SB1-MS2-fwd (GCAGTTTGGATGCCAAAAATTATTCTAAATG) and MS2-EcoRI-rev (GCGAATTCTCCTAATGCCTTCGAT). The resulting SB1-10xMS2 and the SB1 Δ 3-10xMS2 constructs were cleaved with NheI and EcoRI and ligated in pcDNA3.1. The MS2 coat protein fused to the TAP tag was made by PCR using plasmid pRS426-TAP-MS2pX2 and primers

TAP-MS2-BamH-fwd (TAGGATCCATGGCAGGCCTTGCG) and TAP-MS2-XhoI-rev (CCCTCGAGGGCGTCATAGTAGAT) and was inserted into retroviral vector pMSCV. pcDNA3-SB1-10xMS2 or pcDNA3-SB1 Δ 3-10xMS2 and pMSCV-TAP-MS2pX2 were co-transfected in 293 cells that were treated with neomycin and hygromycin to select for stable clones expressing both MS2 tagged RNA and MS2 coat protein. Total cellular extracts prepared from selected clones were used for tandem affinity purification protocol, as described⁴⁸. The final eluates were concentrated by TCA precipitation and were fractionated by SDS-PAGE. After silver staining, bands were cut out and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) (SickKids Hospital, Toronto).

RNA-affinity chromatography

To prepare our RNA-affinity chromatography RNA targets, we first performed a cold transcription using T7 RNA polymerase. RNA substrates were synthesized in vitro from PCR products made of the X2 minigene Reg8-20 and the multiple cloning sites (MCS) region of pCDNA3.1+, using primers T7 B3 (TAATACGACTCACTATAGGTATTATAAAAATGTCTC) and Region 20-18 reverse (CCCTTCTGGGTGTTCTCTTCCAC) for X2 and T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) and RT4 (CTGATCAGCGGGTTTAAACG) for pCDNA3.1+. The in vitro transcription was performed at 37°C for 4 hours in the following conditions : 1 μ g DNA template, 4 mM rNTPs, 1X Frank's buffer (10X : 400 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.1% Triton X-100, 200 mM MgCl₂, 20 mM spermidine), 10 mM DTT, 180 units of T7 RNA polymerase, 0.5 unit of yeast pyrophosphatase. At mid-point, an extra 180 units of T7 RNA polymerase was added to the reaction mix. Following migration in a 6% denaturing polyacrylamide gel (8 M urea), the transcripts were gel-extracted with Crunch Solution (0.2% SDS, 0.3 M sodium acetate), then phenol-chloroform-purified and ethanol precipitated

As for the oxidation of the RNA targets, 1.5 nmol of gel-purified transcripts were incubated for 1 hour at room temperature, protected from light, in a 200 μ L reaction volume containing 100 mM sodium acetate (pH 5.0) and 5 mM sodium meta-periodate (Sigma). The oxidized RNAs were ethanol-precipitated and resuspended in a 500 μ L 100 mM sodium acetate (pH 5.0) solution. Adipic acid dihydrazide beads (Sigma) were washed and equilibrated in 100 mM sodium acetate (pH 5.0), making a 50% slurry solution. 200 μ L of the equilibrated bead slurry was added to a 500 μ L solution of oxidized transcripts and rotated overnight at 4°C. Following washes with a 2 M NaCl solution, then with buffer DG (20 mM HEPES pH 7.9, 20% glycerol, 80 mM monopotassium glutamate, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF and 1 mM DTT) with 60 mM NaCl, RNA coated beads were resuspended in 100 μ L buffer DG + 60 mM NaCl (50% slurry solution). HeLa nuclear extracts (250 μ L) were added to the 100 μ L RNA coated beads solution (final reaction volume increased at 1 mL with buffer DG + 60 mM NaCl) and rotated overnight at 4°C. Following 5 washes with buffer DG + 60 mM NaCl solution, the bound proteins were stepwise eluted with buffer DG containing increasing concentrations of NaCl (100 mM, 200 mM, 400 mM and 1 M). These eluates were precipitated by adding 1 volume of trichloroacetic acid (TCA), incubating for 1 hour on ice, and spinning for 10 min at 4°C (10 000 x g). The pellets were washed with ice cold 0.01 M HCl + 90% acetone and resuspended in 80 μ L 0.1 N NaOH. Ten μ L of the various eluates, in Laemmli buffer (2X : 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 4.6% SDS, 0.125 M Tris and 0.1% bromophenol blue) were loaded in a 10% polyacrylamide gel and, following migration, stained with silver nitrate, and the bands of interest were cut out and analyzed by LC-MS/MS (SickKids Hospital, Toronto).

Transfection and cell treatment

Human 293 cells (ECR293, Invitrogen) were grown at 37 °C (5% CO₂) in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% glutamine (Wisent). Oxaliplatin was obtained from the Service Pharmaceutique du Centre de Chimiothérapie at the Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke.

For plasmids transfections, 293 cells (4×10^5) were plated in 35-mm² wells. Twenty-four hours later, 1 µg of DNA and 5 µl of polyethyleneimine (1 µg/µl) were incubated for 20 min in 100 µl (final volume) of Opti-MEM before being added to the wells, which contained 1 mL of DMEM. Five hours later, 1 mL of DMEM with or without oxaliplatin was added to each well. Cells were harvested 18 h later, and RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen).

For knockdowns, 293 cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 80 nM of anti-14-3-3ε siRNA (sc-29588, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Mississauga, Ontario, Canada) an A1-specific siRNA (AAUGGGGAACGCUCACGGACUdTdT), an A2-specific siRNA (AACCACAGAAGAAAGUUUGAGdTdT) or a Sam68-specific siRNA (AUAACGUCCAUAUGGGUGCdTdT) purchased from IDT. 293 cells were treated for 96 hours with siA1/A2 and 72 hours with siSam68. Twenty-two hours pre-harvest, the cells were treated with or without 25 µM of oxaliplatin. Cells were also transfected with plasmid for enhanced YFP-fused-difoepin expression (pSCM138; kindly provided by Dr. Haian Fu, School of Medicine, Emory University). Proteins and RNA were extracted to verify depletion through immunoblot analysis and endogenous *Bcl-x* splicing profiles using RT-PCR.

RT-PCR assays

Total RNA was extracted from treated or transfected cells with TRIzol (Invitrogen) using the procedure described by the manufacturer. The splicing profile of *Bcl-x* was assessed by RT-PCR. Reverse transcription was done using the OmniScript RT kit (Qiagen) with random

hexamers for endogenously derived *Bcl-x* mRNAs, whereas oligonucleotides RT-Sveda-Rev (GGGAAGCTAGAGTAAGTAG) was used for the SVEDA-2 plasmid-derived mRNAs and RT3 (GAAGGCACAGTCGAGGCTG) was used for the pcDNA 3.1+ plasmid-derived mRNAs. One fifth of cDNA material was used as template for the PCR. Primers X3 (ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG) and X2 (TCATTTCCGACTGAAGAGTGA) were used to amplify fragments of splicing isoforms derived from endogenous *Bcl-x*, whereas primers X34 (AGGGAGGCAGGCGACGGCGACGAGTTT) and X-Age-Rev (CTTACCGGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAT) were used for the SVEDA-2 plasmid-derived cDNA and T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) and RT4 (CTGATCAGCGGGTTTAAACG) were used for pcDNA3.1+ plasmid-derived cDNA. For the conventional PCR, [α -³²P]dCTP (PerkinElmer Canada Inc.) was added to PCR mixtures, and amplification products were fractionated onto a 4% native polyacrylamide gel. Gels were exposed on screens that were scanned on a STORM PhosphorImager 860 (GE Healthcare). The intensity of the bands was quantified using the Image-Quant software.

As for the apoptotic and cell cycle control and DNA repair splicing units, RT-PCR were performed by the RNomics Platform of the Université de Sherbrooke. Primers are listed in Supplementary Table S5. Reverse transcription was done using 10 U of Transcriptor reverse transcriptase, 20 U of RNaseOUT (Invitrogen), 3.2 µg of random hexamers, 1 µM of dNTPs mix, 1 X Transcriptor RT reaction buffer and 0.2 – 2 µg of total RNA. PCR was done using 0.2 U of Platinum Taq, 0.6 µM of primers, 1.5 mM of MgCl₂, 10 ng of cDNA template, 1X of PCR buffer and 200 µM of dNTPs mix. PCR reactions were performed on thermocyclers GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Scientific-Invitrogen). A first cycle of 15 min at 95 °C was followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C. The reaction was ended with the extension step of 10 min at 72 °C. Visualization and analysis of amplified products were done

using automated chip-based microcapillary electrophoresis on Labchip GX Touch HT instruments (Perkin Elmer).

Immunoblots and protein immunoprecipitation assays

To assess the efficiency of depletion, total proteins were extracted from mock treated and siRNAs treated cells and standard Western analysis was performed using anti-14-3-3 ϵ (Biolegend, #637901), anti-hnRNP A1/A2 (custom made, CHUL, Ste-Foy, Québec)⁴⁹ and anti-Sam68 (07-415, Upstate) antibodies. Recombinant proteins were revealed with primary antibodies against the HA-tag (Roche 12CA5), the FLAG-tag (Sigma F3165), actin (Sigma 2066), tubulin (ab4074, Abcam), using peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL detection reagent (Amersham). Secondary antibodies were either polyclonal anti-rabbit (Cell Signalling 7074) or anti-mouse (BioCan 115-035-003).

RNA immunoprecipitation and RT-qPCR analysis

ECR293 cells treated with 20 μ M of oxaliplatin for 24 hours. After washing with PBS, the cell pellet was resuspended into NET-2 buffer supplemented with protease and RNase inhibitors. Cells were lysed by sonication and the insoluble material was removed by centrifugation at 4°C. The supernatant was precleared by incubation for 1 hour at 4°C with SureBeads Protein G Magnetic beads (BioRad #161-4023) previously blocked with yeast tRNA. An aliquot of the precleared supernatant was used as input while the remaining material was used for immunoprecipitation. Precleared whole-cell lysates of equal protein quantities were incubated overnight at 4°C with SureBeads Protein G Magnetic beads coated with antibodies against hnRNP F, H, A1 and Sam68. Beads were washed 4 times with NET-2. RNA was extracted by applying TRIzol directly on washed magnetic beads. Extracted RNA was resuspended in 15 μ L

of H₂O, treated with DNase I for 15 min at 37°C, and quantitated by spectrometry. Equal quantities of RNA were reverse transcribed using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) enzyme and the primer X-Int2-1-REV (CAGAGGCCAAAGAAAAGGGACACA) annealing in intron 2 of *Bcl-x*. Quantitative PCR was carried out using SYBR green (2× Power SYBR green master mix; ABI 4367660) and primers X-Int2-2-REV (CACACAAGGGGCTTGGTTCTTA) and X-EX-S1-FWD (TCACCCCAGGGACAGCATATC). The method used to determine the relative abundance of *Bcl-x* pre-mRNA in immunoprecipitates compared Ct using the input sample (pre-immunoprecipitated) as reference, while the difference between control and oxaliplatin-treated samples was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and was expressed as fold change of *Bcl-x* pre-mRNA recovered from oxaliplatin-treated samples versus the non-treated control.

REFERENCES

1. Fu XD, Ares M, Jr. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature reviews Genetics* **15**, 689-701 (2014).
2. Lovci MT, *et al.* Rbfox proteins regulate alternative mRNA splicing through evolutionarily conserved RNA bridges. *Nature structural & molecular biology* **20**, 1434-1442 (2013).
3. Shkreta L, Cloutier A, Toutant J, Vennin Rendos H, Chabot B. Regulation of alternative splicing and the case of Bcl-x. *Pak J Biochem Mol Biol* **48**, 27-38 (2015).
4. Chiou NT, Shankarling G, Lynch KW. hnRNP L and hnRNP A1 induce extended U1 snRNA interactions with an exon to repress spliceosome assembly. *Molecular cell* **49**, 972-982 (2013).
5. Bonnal S, Martinez C, Forch P, Bachi A, Wilm M, Valcarcel J. RBM5/Luca-15/H37 regulates Fas alternative splice site pairing after exon definition. *Molecular cell* **32**, 81-95 (2008).
6. Sharma S, Falick AM, Black DL. Polypyrimidine tract binding protein blocks the 5' splice site-dependent assembly of U2AF and the prespliceosomal E complex. *Molecular cell* **19**, 485-496 (2005).

7. Shkreta L, Chabot B. The RNA splicing response to DNA damage. *Biomolecules* **5**, 2935-2977 (2015).
8. Giono LE, Nieto Moreno N, Cambindo Botto AE, Dujardin G, Munoz MJ, Kornblihtt AR. The RNA Response to DNA Damage. *Journal of molecular biology* **428**, 2636-2651 (2016).
9. Paronetto MP, Minana B, Valcarcel J. The Ewing sarcoma protein regulates DNA damage-induced alternative splicing. *Molecular cell* **43**, 353-368 (2011).
10. Dutertre M, *et al.* Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nature structural & molecular biology* **17**, 1358-1366 (2010).
11. Savage KI, *et al.* Identification of a BRCA1-mRNA splicing complex required for efficient DNA repair and maintenance of genomic stability. *Molecular cell* **54**, 445-459 (2014).
12. Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *The Journal of cell biology* **176**, 929-939 (2007).
13. Cloutier P, Toutant J, Shkreta L, Goekjian S, Revil T, Chabot B. Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x. *The Journal of biological chemistry* **283**, 21315-21324 (2008).
14. Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* **142**, 625-636 (2010).
15. Naro C, Barbagallo F, Chieffi P, Bourgeois CF, Paronetto MP, Sette C. The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival. *Nucleic acids research* **42**, 3218-3227 (2014).
16. Merdzhanova G, *et al.* E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ* **15**, 1815-1823 (2008).
17. Bielli P, Bordi M, Di Biasio V, Sette C. Regulation of BCL-X splicing reveals a role for the polypyrimidine tract binding protein (PTBP1/hnRNP I) in alternative 5' splice site selection. *Nucleic acids research* **42**, 12070-12081 (2014).
18. Shkreta L, Toutant J, Durand M, Manley JL, Chabot B. SRSF10 connects DNA damage to the alternative splicing of transcripts encoding apoptosis, cell-cycle control, and DNA repair factors. *Cell reports* **17**, 1990-2003 (2016).
19. Revil T, Pelletier J, Toutant J, Cloutier A, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21458-21467 (2009).

20. Garneau D, Revil T, Fisette JF, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *The Journal of biological chemistry* **280**, 22641-22650 (2005).
21. Dominguez C, Fisette JF, Chabot B, Allain FH. Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs. *Nature structural & molecular biology* **17**, 853-861 (2010).
22. Massiello A, Roesser JR, Chalfant CE. SAP155 binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA. *Faseb J* **20**, 1680-1682 (2006).
23. Wang Y, *et al.* The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer Cell* **26**, 374-389 (2014).
24. Pedrotti S, Busa R, Compagnucci C, Sette C. The RNA recognition motif protein RBM11 is a novel tissue-specific splicing regulator. *Nucleic acids research* **40**, 1021-1032 (2012).
25. Zhou A, Ou AC, Cho A, Benz EJ, Jr., Huang SC. Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection. *Molecular and cellular biology* **28**, 5924-5936 (2008).
26. Inoue A, Yamamoto N, Kimura M, Nishio K, Yamane H, Nakajima K. RBM10 regulates alternative splicing. *FEBS letters* **588**, 942-947 (2014).
27. Michelle L, *et al.* Proteins associated with the exon junction complex also control the alternative splicing of apoptotic regulators. *Molecular and cellular biology* **32**, 954-967 (2012).
28. Montes M, *et al.* TCERG1 regulates alternative splicing of the Bcl-x gene by modulating the rate of RNA polymerase II transcription. *Molecular and cellular biology* **32**, 751-762 (2012).
29. Bielli P, *et al.* The transcription factor FBI-1 inhibits SAM68-mediated BCL-X alternative splicing and apoptosis. *EMBO reports* **15**, 419-427 (2014).
30. Almeida LO, Garcia CB, Matos-Silva FA, Curti C, Leopoldino AM. Accumulated SET protein up-regulates and interacts with hnRNPK, increasing its binding to nucleic acids, the Bcl-xS repression, and cellular proliferation. *Biochemical and biophysical research communications* **445**, 196-202 (2014).
31. Shi Y, Manley JL. A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Molecular cell* **28**, 79-90 (2007).
32. Chalfant CE, *et al.* De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry* **277**, 12587-12595 (2002).

33. Revil T, Toutant J, Shkreta L, Garneau D, Cloutier P, Chabot B. Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing. *Molecular and cellular biology* **27**, 8431-8441 (2007).
34. Shultz JC, Vu N, Shultz MD, Mba MU, Shapiro BA, Chalfant CE. The proto-oncogene PKC η regulates the alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA. *Molecular cancer research : MCR* **10**, 660-669 (2012).
35. Shkreta L, Michelle L, Toutant J, Tremblay ML, Chabot B. The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *The Journal of biological chemistry* **286**, 331-340 (2011).
36. Cao W, *et al.* Targeting 14-3-3 protein, difopein induces apoptosis of human glioma cells and suppresses tumor growth in mice. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **15**, 230-241 (2010).
37. Blasius M, Wagner SA, Choudhary C, Bartek J, Jackson SP. A quantitative 14-3-3 interaction screen connects the nuclear exosome targeting complex to the DNA damage response. *Genes & development* **28**, 1977-1982 (2014).
38. Roy R, *et al.* hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling. *Nucleic acids research* **42**, 12483-12497 (2014).
39. Wilker EW, *et al.* 14-3-3 σ controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature* **446**, 329-332 (2007).
40. Cabodi S, Calautti E, Talora C, Kuroki T, Stein PL, Dotto GP. A PKC- η /Fyn-dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation. *Molecular cell* **6**, 1121-1129 (2000).
41. Crosby D, Poole AW. Physical and functional interaction between protein kinase C δ and Fyn tyrosine kinase in human platelets. *The Journal of biological chemistry* **278**, 24533-24541 (2003).
42. Hsu KL, *et al.* Protein kinase C-Fyn kinase cascade mediates the oleic acid-induced disassembly of neonatal rat cardiomyocyte adherens junctions. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**, 1536-1546 (2009).
43. Baldin V, *et al.* Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* **14**, 2485- 2495 (1997).
44. Flanagan JG, Chan DC, Leder P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* **64**, 1025-1035 (1991).
45. Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Molecular biology of the cell* **3**, 349-362 (1992).

46. Tranchevent LC, *et al.* Identification of protein features encoded by alternative exons using Exon Ontology. *Genome research*, (2017).
47. Damianov A, *et al.* Rbfox proteins regulate splicing as part of a large multiprotein Complex LASR. *Cell* **165**, 606-619 (2016).
48. Séraphin B, Puig O, Bouveret E, Rutz B, Caspary F. Tandem affinity purification to enhance interacting protein identification. In: *Protein-protein interactions: a molecular cloning manual* (eds Golemis EA, Adams PD). Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002). pp. 313-328.
49. Patry C, *et al.* Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticle A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer research* **63**, 7679-7688 (2003).
50. Szklarczyk D, *et al.* STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* **43**, D447-452 (2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Stephane Richard, Haian Fu and Raymund Wellinger for reagents. This study was supported by CIHR grant MOP-136948 to BC and the Canada Research Chair in Functional Genomics. BC is the Pierre C. Fournier Chair in Functional Genomics. AC was supported by a NSERC scholarship.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

AC, LS and BC conceived the experiments. AC, LS, JT and MD carried out the assays; PT contributed to some of the data analysis; BC wrote the manuscript, with input from all authors.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Mutagenesis of the SB1 element in *Bcl-x* exon 2. *A*, Structure of the human *Bcl-x* pre-mRNA and its two splice variants anti-apoptotic Bcl-xL and the shorter pro-apoptotic isoform Bcl-xS. The portion included in minigene X2 and deleted in minigenes Δ SB1, Δ B2 and Δ B2G is shown on the right. Primer positions for RT-PCR assays from endogenous and minigene *Bcl-x* transcripts are shown. *B*, The graph plots the percentage of Bcl-xS mRNA obtained by RT-PCR analysis for each mutation relative to the wild-type X2 minigene. The SB1 element was divided into 31 segments of 10 nt. One round of mutations changed A, G, C and T into T, C, G and A, respectively (transversions). A second set of mutations produced deletions of selected segments. Finally, specific segments were mutated by changing the wild-type sequence for GACTCAGTGT. Categorization of segments as displaying enhancer or silencer activity only considers the impact of deletions greater than 10 percentage points. *C*, RT-PCR assays on total RNA extracted from ECR293 cells transfected with X2, Δ SB1 and Δ SB1+Reg9-19 minigenes. The Reg9-19 region was inserted 279 nucleotides upstream of Bcl-xS 5'ss. The percentage of Bcl-xS is an average of triplicates. Error bars indicate SD. Asterisks represent significant *P* values (two-tailed Student's *t* test) comparing the means between samples and their respective controls. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$; n.s. = not significant.

Figure 2. 14-3-3 ϵ modulates *Bcl-x* splicing and its response to DNA damage. *A*, A plasmid programmed to express HA-14-3-3 ϵ was co-transfected with minigenes X2 or Δ SB1. Expression of HA-14-3-3 ϵ was confirmed by immunoblots shown on *top*. Detection of actin was used as a loading control. The impact on *Bcl-x* splicing was monitored by RT-PCR assays using a minigene-specific pair of primers; radiolabeled RT-PCR products are shown for one experiment

with the positions of the Bcl-xS and Bcl-xL products indicated. Histograms represent the average production of Bcl-xS in percentage from triplicates with standard deviations. The CTRL samples was transfected with the *Bcl-x* minigenes only, whereas pCDNA3.1 is an empty expression plasmid. *B*, Following treatment of 293 cells with si14-3-3 ϵ , an immunoblot was performed with anti-14-3-3 ϵ antibodies (*top*). Detection of tubulin was used as a loading control. The *middle* panel shows one representative RT-PCR analysis of *Bcl-x* splicing, while the *bottom* panel displays the production of Bcl-xS from triplicate experiments. *C*, Same as in *B*, except that difopein (eYFP-D) was used to inactivate 14-3-3 proteins. *D*, Cells treated or not with si14-3-3 ϵ were transfected with HA-SRSF10 and the X2 minigene. Immunoblots shown on top are displaying the depletion of 14-3-3 ϵ and the expression of HA-SRSF10. *E*, Same as in *D*, except that eYFP-D was used to inactivate 14-3-3 proteins. *F*, Immunoprecipitation assays using 293 cells treated or not with oxaliplatin and transfected or not with HA-14-3-3 ϵ and FLAG-SRSF10. The material recovered was fractionated on gel and transferred on nitrocellulose decorated with anti-FLAG and anti-HA antibodies. “xx” and “x” respectively indicate the large and small immunoglobulin subunits that react with the secondary antibody. *G*, RT-PCR assays on *Bcl-x* after cells were transfected with *Bcl-x* minigenes, X2, Δ B2 and Δ B2G (the position of the B2 and B2G elements is shown in Figure 1A) along with the HA-14-3-3 ϵ expression plasmid. Expression of HA-14-3-3 ϵ was confirmed by immunoblotting (shown on *top*). *H*, Cells treated with the siRNA against 14-3-3 ϵ were incubated or not with oxaliplatin and a RT-PCR assay was conducted to determine the impact of these treatments on the production of endogenous Bcl-xS. Immunoblots confirming the depletion are shown on *top*. The position of molecular weight markers (in kDa) is indicated in immunoblots. In all cases, error bars indicate SD, and asterisks represent significant *P* values (two-tailed Student’s *t* test) comparing the

means between samples and their respective controls. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$; n.s. = not significant.

Figure 3. The depletion of hnRNP A1/A2 and Sam68 impairs the DDR modulation of *Bcl-x* splicing.

A, RT-PCR assays on endogenous *Bcl-x* transcripts using total RNA extracted from 293 cells transfected with siA1/A2 (96 hours). Cells were treated with or without 25 μ M of oxaliplatin for the last 22 hours. The immunoblot analysis is shown, with tubulin as a loading control. **B**, RT-PCR assays on X2 transcripts using total RNA extracted from 293 cells transfected with the X2 minigene, siA1/A2 and HA-SRSF10. The immunoblot analysis of the depletion is shown. **C**, RT-PCR assays on endogenous *Bcl-x* transcripts using total RNA extracted from 293 cells transfected with siSam68 (72 hours) and treated with or without 25 μ M of oxaliplatin for the 22 hours of that period. The immunoblot analysis to confirm the depletion of Sam68 is shown. In panels *A-C*, the percentage of the Bcl-xS variant is plotted based on experiments performed in triplicates. **D**, Anti-hnRNP A1 immunoprecipitation assays using 293 cells treated or not with oxaliplatin and transfected or not with both HA-14-3-3 ϵ and FLAG-SRSF10. The material recovered was fractionated and transferred on nitrocellulose decorated with anti-FLAG antibodies. Note that the input section of the gel is the same as the input section published in ref. 18 since the original experiment included immunoprecipitations presented in both reports. **E**, Immunoprecipitation assays using 293 cells treated or not with oxaliplatin and transfected or not with HA-14-3-3 ϵ . The material recovered was fractionated and transferred on nitrocellulose decorated with anti-hnRNP A1/A2 antibodies. “xx” and “x” respectively indicate the large and small immunoglobulin subunits that react with the secondary antibody. **F**, Immunoprecipitations were carried out on cells treated or not with oxaliplatin. The recovered RNA was quantitated for *Bcl-x* pre-mRNA using primers shown on *top*. Raw data from this and

two others assays are provided in Supplementary Table S1. The differential between values obtained for each antibody comparing the impact of oxaliplatin is plotted in histograms. The result obtained with IgG control immunoprecipitations is provided in Supplementary Table S1. Error bars indicate SD. Asterisks represent significant P values (two-tailed Student's t test) comparing the means between samples and their respective controls; $*$ = $P < 0.05$, $**$ = $P < 0.01$ and $***$ = $P < 0.001$; n.s. = not significant.

Figure 4. *Bcl-x* pre-mRNA splicing control is rewired by DNA damage. *A*, Repressor complex representing the major regulatory assembly in normally growing 293 cells. *B*, Activating complex proposed to represent a minor fraction of *Bcl-x* transcripts in normal growth conditions. *C*, Activated complex assembled upon DNA damage. For simplicity, A1 is used to indicate hnRNP A1/A2 proteins.

Figure 5. hnRNP A1/A2, Sam68 and SRSF10 control the splicing response to DNA damage. *A*, ECR293 cells were transfected with sihnRNP A1/A2 (96 hours) or siSam68 (72 hours). Cells were treated 22 hours with or without 25 μ M of oxaliplatin. Immunoblot analysis was performed with corresponding antibodies to confirm the depletion. *B*, Summary of the oxaliplatin-sensitive alternative splicing events (ASE) that were reactive to the depletion of hnRNP A1/A2, Sam68 and SRSF10. *C*, RT-PCR analysis of oxaliplatin reactive ASEs sensitive to the depletion of hnRNP A1/A2. *D*, RT-PCR analysis of oxaliplatin reactive ASEs sensitive to the depletion of Sam68. The histograms display percent splicing index (PSI). Above each histogram are electropherograms obtained from capillary electrophoresis. The size of expected RT-PCR products and the alternative exon is indicated in Supplementary Table S5. P values for differences are indicated in Supplementary Tables S2 and S3.

Figure 6. Splicing regulatory network. Graphical representation of splicing regulation of a functional interaction network of proteins involved in DDR. Circles (nodes) correspond to genes with ASEs that respond to oxaliplatin and that are regulated by hnRNP A1/A2, Sam68 and SRSF10. Lines (edges) indicate interactions and their thickness indicates confidence in data that support the interaction based on the STRING database⁵⁰. Only components with connections are shown (18 of 34 of the oxaliplatin-sensitive ASEs regulated by the three RBPs). Circle coloring indicates proteins involved in apoptosis, DNA repair and cell-cycle control (red, black and yellow, respectively).

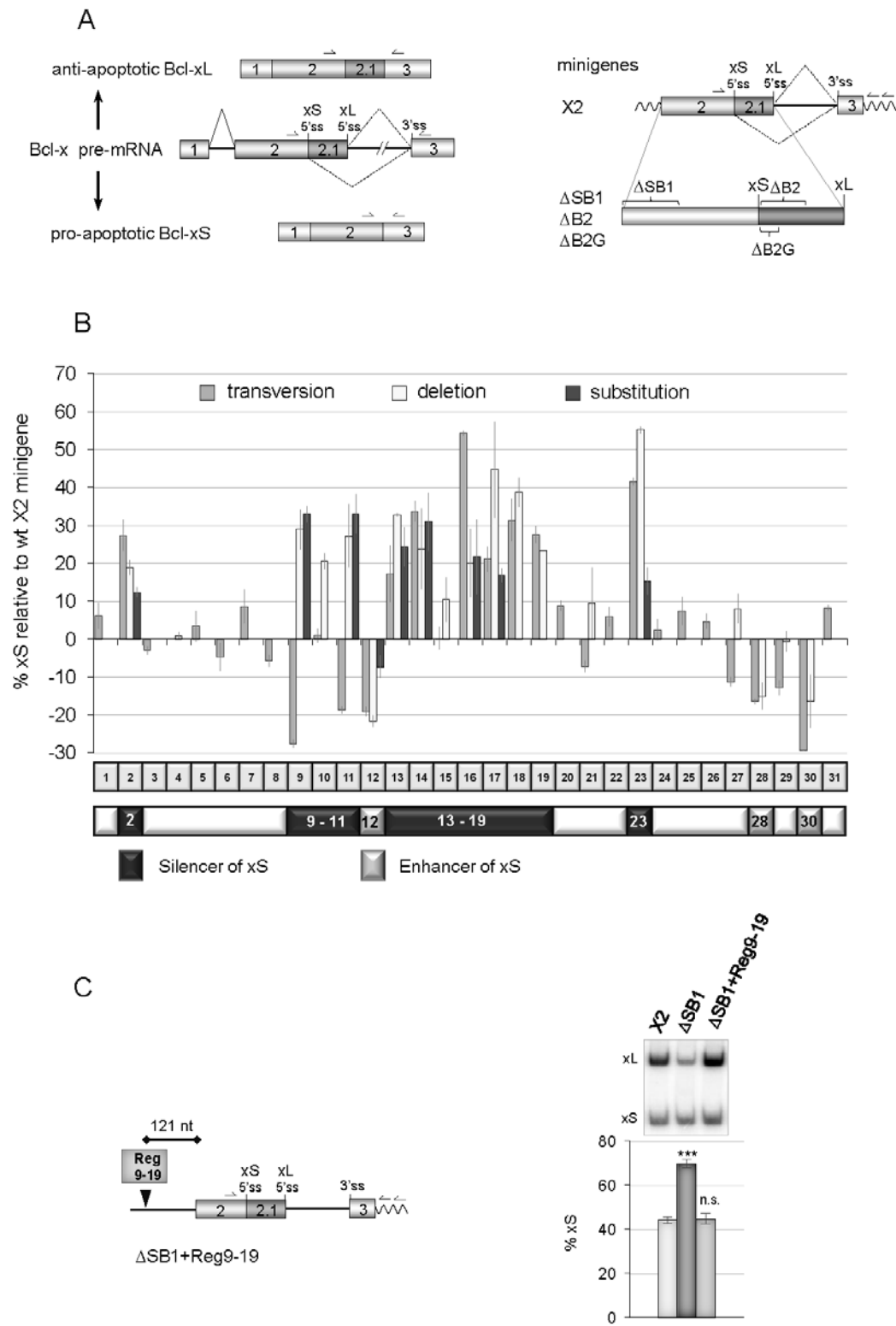


FIGURE 1

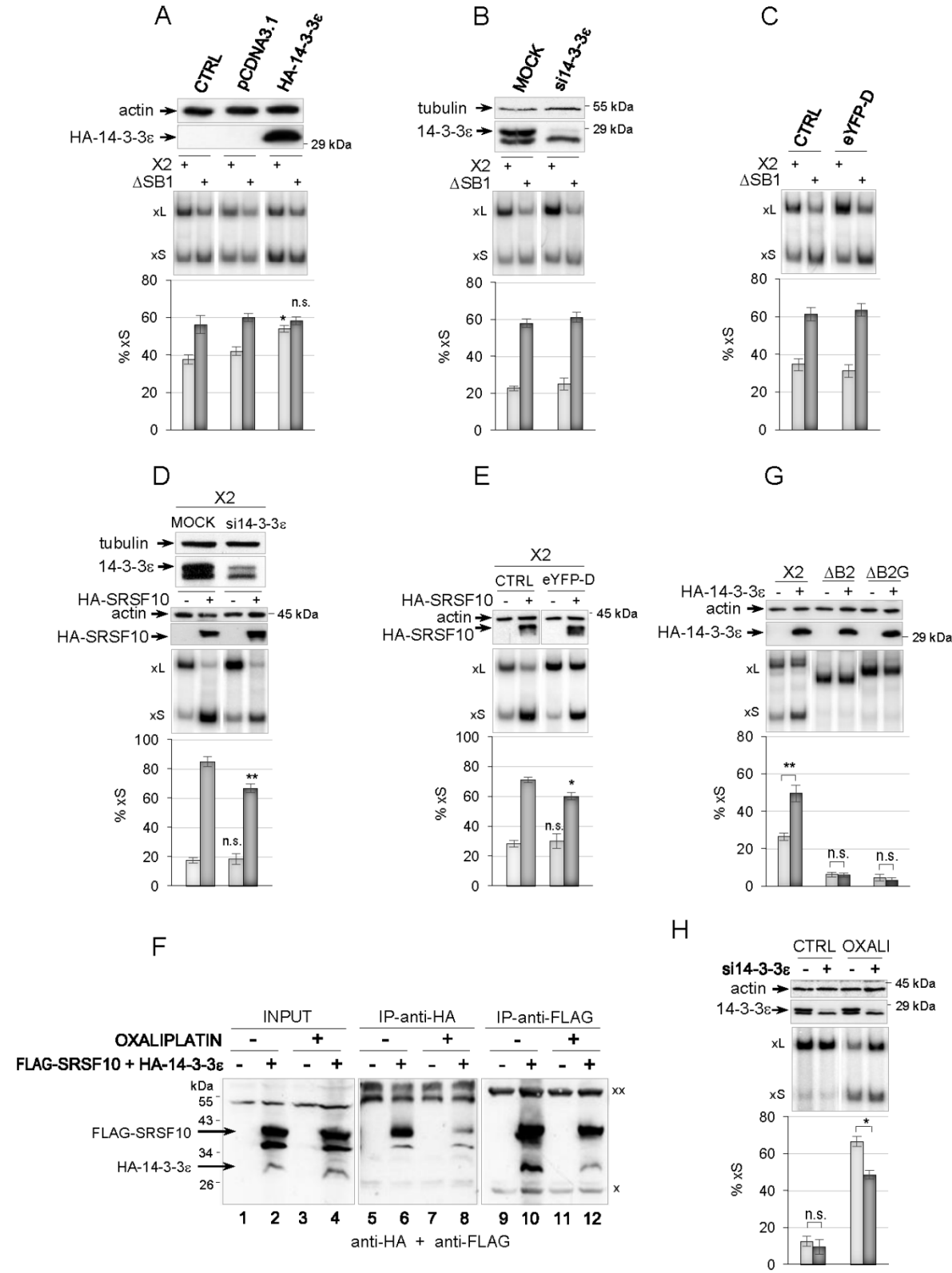


FIGURE 2

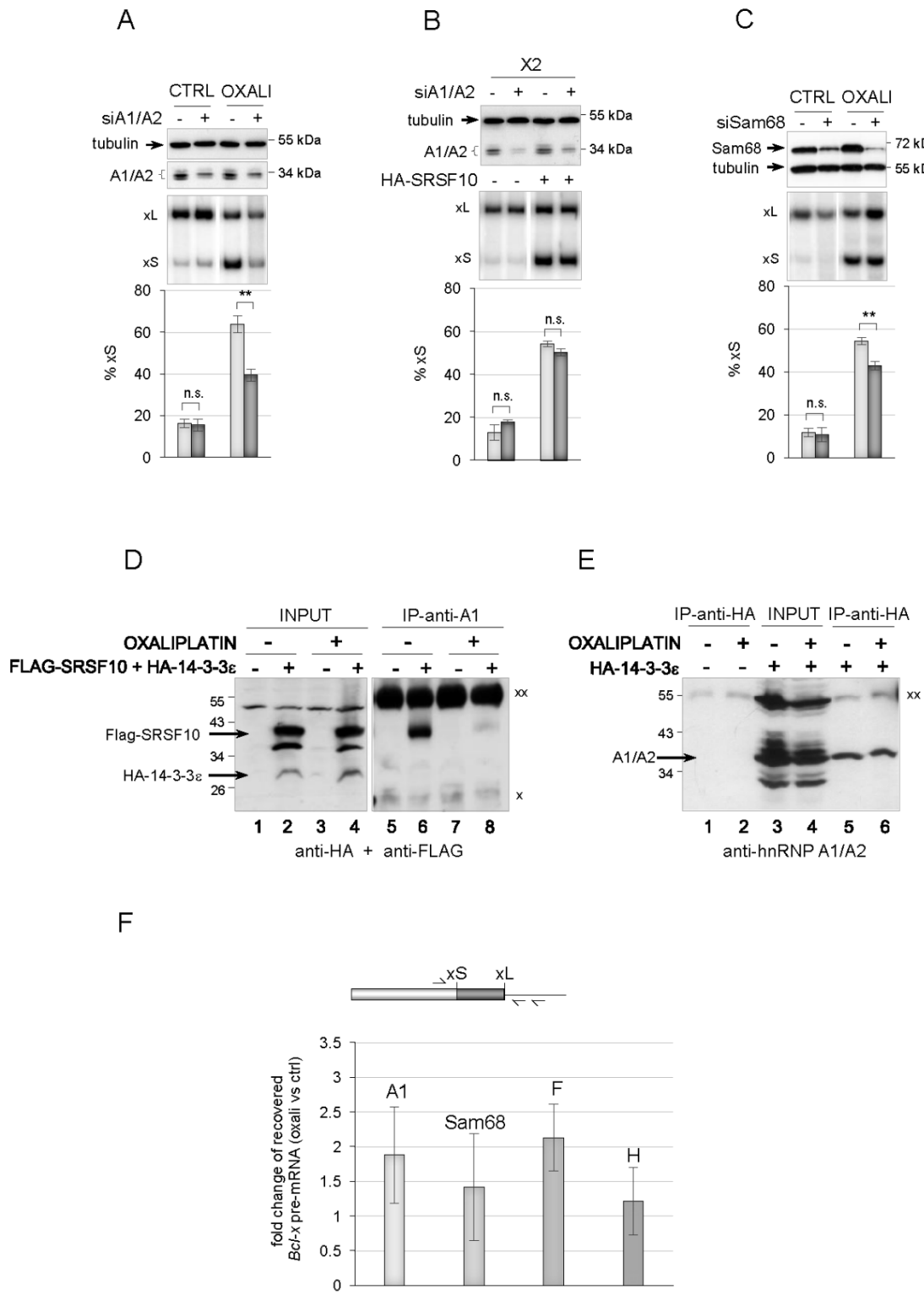


FIGURE 3

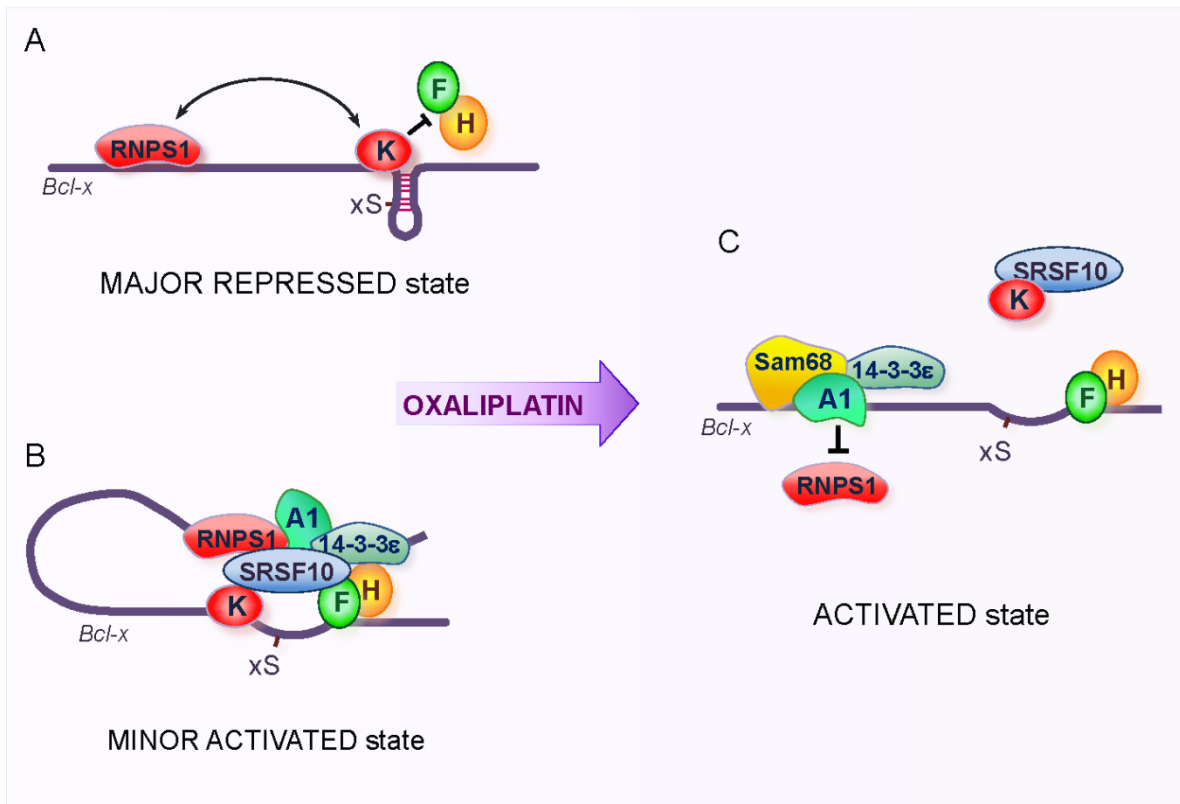


FIGURE 4

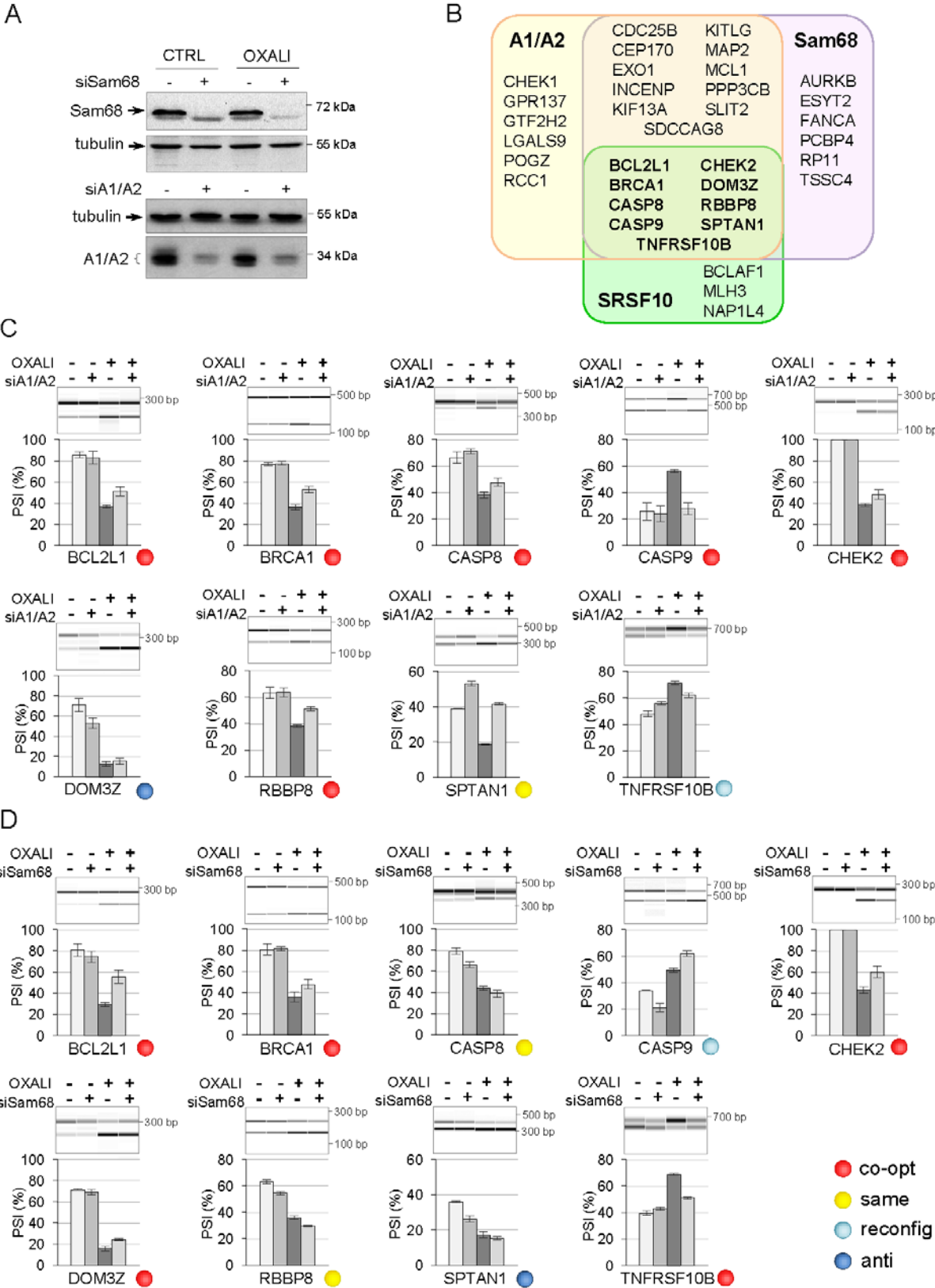


FIGURE 5

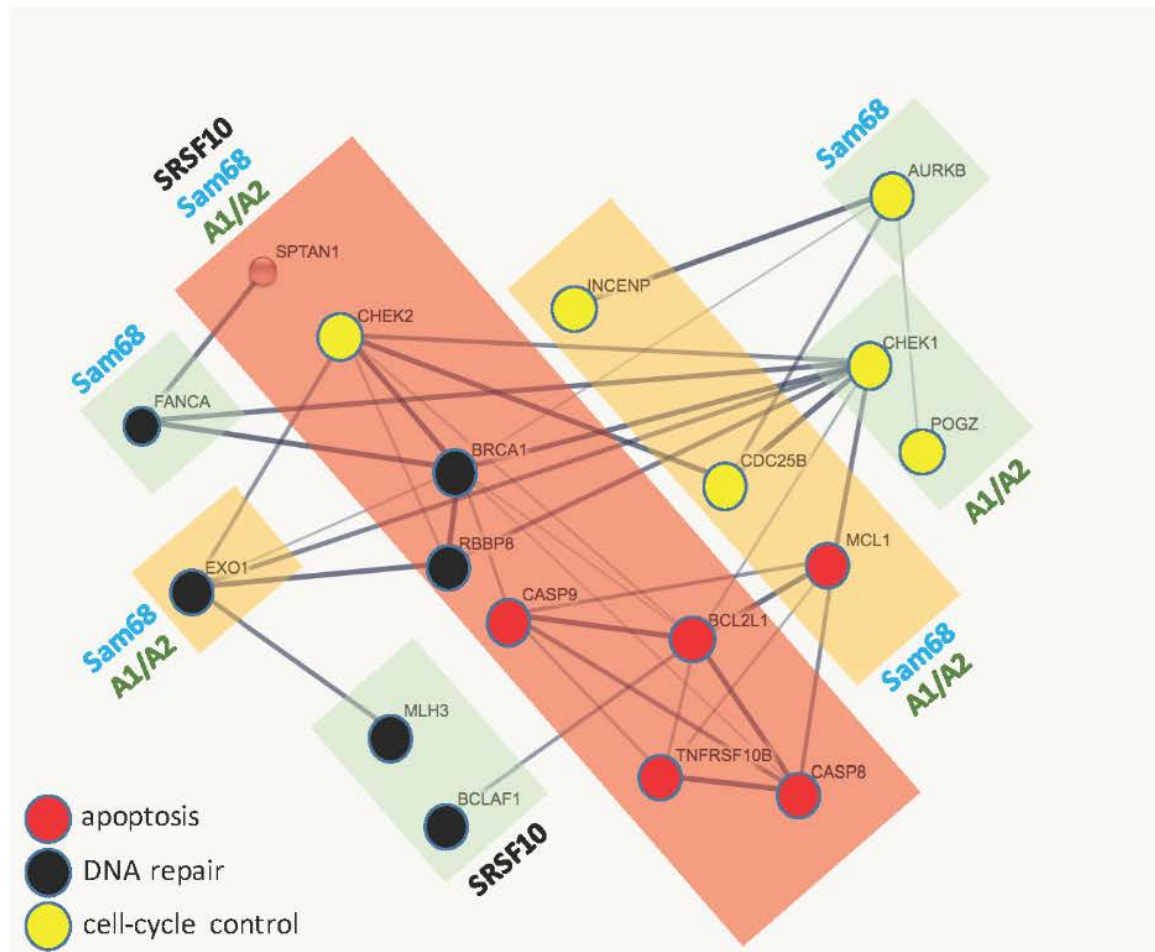


Figure 6

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table S1. RT-qPCR values for immunoprecipitation of *Bcl-x* pre-mRNA.

The anti-hnRNP A1, anti-hnRNP F, anti-Sam68 and anti-hnRNP H antibodies were used in extracts prepared from cells treated or not with oxaliplatin. RT-qPCR was performed on the same amount of RNA for input and immunoprecipitated material from both conditions (oxaliplatin-treated and untreated). Ct values for all tests are indicated. After calculating the ΔCt for each pair of IP/input, $\Delta\Delta\text{Ct}$ values were calculated for oxaliplatin-treated/untreated pair, and their averages were used to obtain a fold-difference value, as described in Methods. A control antibody (IgG) was also used. Values obtained with IP-Assay #1 were used to produce Figure 3F.

Supplementary Table S2. Oxaliplatin-sensitive ASEs that are regulated by hnRNP A1/A2.

ASEs are ranked by order of sensitivity to oxaliplatin based on the average ΔPSI relative to the untreated controls. ASEs displaying a $\Delta\text{PSI} > |10|$ with a P value smaller than 0.05 are indicated in salmon color. The reactivity to the depletion of hnRNP A1/A2 are then indicated (in normal growth conditions or in oxaliplatin treated cells). $\Delta\text{PSI} > |5|$ with a P value < 0.05 are considered regulated by hnRNP A1/A2 and are compared when cells are treated or not with oxaliplatin. Differences in shifting behavior are indicated in column W as *same*, *co-opt*, *anti* and *reconf*. Standard deviations and P values for the differences are given. All assays were performed in triplicates.

Supplementary Table S3. Oxaliplatin-sensitive ASEs that are regulated by Sam68. ASEs

are ranked by order of sensitivity to oxaliplatin based on the average Δ PSI relative to the untreated controls. ASEs displaying a Δ PSI $> |10|$ with a P value smaller than 0.05 are indicated in salmon color. The reactivity to the depletion of Sam68 are then indicated (in normal growth conditions or in oxaliplatin treated cells). Δ PSI $> |5|$ with a P value < 0.05 are considered regulated by Sam68 and are compared between growth conditions (with or without oxaliplatin). Differences in shifting behavior are indicated in column W as *same*, *co-opt*, *anti* and *reconf*. Standard deviations and P values for the differences are given. All assays were performed in triplicates.

Supplementary Table S4. Oxaliplatin-sensitive ASEs regulated by SRSF10. Results are from Shkreta et al. (2016). ASEs are ranked by order of sensitivity to oxaliplatin based on the average Δ PSI relative to the untreated controls. ASEs displaying a Δ PSI $> |10|$ with a P value smaller than 0.05 are indicated in salmon color. The reactivity to the depletion of SRSF10 is then indicated (in normal growth conditions or in oxaliplatin treated cells). Δ PSI $> |5|$ with a P value < 0.05 are considered regulated by SRSF10 and are compared between growth conditions (with or without oxaliplatin). Differences in shifting behavior are indicated in column W as *same*, *co-opt*, *anti* and *reconf*. Standard deviations and P values for the differences are given. All assays were performed in triplicates.

Supplementary Table S5. Primers used for endpoint RT-PCR of various cellular splicing units and size of amplicons.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure S1. The SB1 element and its subregions. *A*, Wild-type sequence of the 31 subregions that form the SB1 element. *B*, Sequence of the transversion mutants for each of the 31 subregions.

Supplementary Figure S2. RNA binding assays used to recover proteins associating with SB1. *A*, Procedure for the recovery of SB1-interacting proteins by expressing a SB1-MS2 hybrid RNA and a control SB1 Δ 3-MS2 version. The SB1 Δ 3-MS2 RNA harbors deletions of segments Reg11, Reg17 and Reg23. *B*, Impact of the individual deletions on *Bcl-x* splicing as measured by RT-PCR. *C*, qRT-PCR was used to monitor the abundance of SB1-MS2 and SB1 Δ 3-MS2 in two stably expressing clones. *D*, An immunoblot analysis was performed to detect the co-expressed TAP-MS2 protein in the stably expressing clones of panel *C*. *E*, Silver-stained gel of recovered proteins following tandem affinity purification. The band analyzed by mass spectrometry is indicated. *F*, Schematic representation of the *in vitro* RNA-affinity chromatography assay. Acid adipic dihydrazide agarose beads were coated with oxydized RNA to which we added HeLa nuclear extracts. Bound proteins were eluted with increasing concentrations of NaCl. *G*, SDS-Page gel with 200 mM NaCl eluates and mass spectrometry results. The various eluates from the RNA-affinity chromatography assay were loaded on a 10 % SDS-polyacrylamide and stained with silver nitrate. The bands of interest were cut out and analysed by mass spectrometry. *H*, Based on the optimal site for hnRNP A1 TAG^A/G^TGT⁵¹, putative binding sites for hnRNP A1 and A2 are highlighted (in gray) within the target region (central repressive subregion of SB1).

Supplementary Figure S3. hnRNP A1/A2 hits. RT-PCR analysis of oxaliplatin reactive ASEs upon depletion of hnRNP A1/A2 in untreated and oxaliplatin-treated ECR293 cells. The histograms display percent splicing index (PSI). The sizes of expected RT-PCR products and

the alternative exon are indicated in Supplementary Table S5. *P* values for differences are indicated in Supplementary Table S2. A. hnRNP A1/A2 hits that are shared with Sam68 (see Supplementary Figure S4). B. Hits that are unique to hnRNP A1/A2.

Supplementary Figure S4. Sam68 hits. RT-PCR analysis of oxaliplatin reactive ASEs upon depletion of Sam68 in untreated and oxaliplatin-treated ECR293 cells. The histograms display percent splicing index (PSI). The sizes of expected RT-PCR products and the alternative exon are indicated in Supplementary Table S5. *P* values for differences are indicated in Supplementary Table S3. *A*, Sam68 hits that are shared with hnRNP A1/A2 (see Supplementary Figure S3). *B*, Hits that are unique to Sam68.

Supplementary Figure S5. SRSF10 hits. RT-PCR analysis of oxaliplatin reactive ASEs upon depletion of SRSF10. Data is taken from Shkreta et al. (2016). The histograms display percent splicing index (PSI). The sizes of expected RT-PCR products and the alternative exon are indicated in Supplementary Table S5. *P* values for differences are indicated in Supplementary Table S4.

SUPPLEMENTARYTABLE S1

Ct SYBR of RNA-IP Assays and FOLD CHANGE of BCL-X transcript quantities associated with hnRNP A, F, H, and Sam68 proteins after oxaliplatin treatment .

The results of assay #1 are presented in the final graph of RNA-IP shown in the paper.

IP-Assay # 1

Ct SYBR	cDNA-Primer 3-REV, PCR-Primers 3-REV + 8-FWD					
	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT 1	24,45	24,66	24,28	25,15	25,18	25,47
IP-A1	23,96	24,4	24,39	24,44	23,74	24,45
IP-F	24,28	24,45	24,48	24,15	23,96	24,31
IP-IgG	34,27	35,18	36,42	35,34	34,86	36,16
FOLD CHANGE and st.dev						
IP-A1	1,88	0,70				
IP-F	2,13	0,49				
IP-IgG	2,00	1,59				

	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT-2	24,87	25,36	25,3	25,41	25,04	25,23
IP-Sam68	24,18	24,24	24,3	24,18	23,42	23,74
IP-IgG	35,14	36,98	36,27	35,89	35,11	36,68

FOLD CHANGE and st.dev

IP-Sam68	1,48	0,42
IP-IgG	1,55	1,26

	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT-3	24,98	25,19	25,27	25,43	24,74	25,05
IP-H	24,33	24,39	24,47	24,12	24,21	23,95
IP-IgG	36,18	34,85	35,89	35,64	36,67	36,85

FOLD CHANGE and st.dev

IP-H	1,20	0,33
IP-IgG	0,67	0,42

IP-Assay # 2

Ct SYBR	cDNA-Primer 3-REV, PCR-Primers 3-REV + 8-FWD					
	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT 1	23,79	24,59	24,1	24,93	24,77	24,77
IP-A1	24,44	24,3	24,56	24,34	23,79	24,5
IP-F	24,88	24,99	24,36	24,25	24,12	24,5
IP-IgG	34,27	35,18	36,42	35,34	34,86	36,16
FOLD CHANGE and st.dev						
IP-A1	1,95	0,76				
IP-F	2,28	0,74				
IP-IgG	1,84	1,51				

	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT-2	25,13	25,57	24,86	25,79	24,63	24,91
IP-Sam68	25,71	25,4	25,66	24,69	24,84	24,85
IP-IgG	35,49	36,36	36,63	35,69	36,58	35,42

FOLD CHANGE and st.dev

IP-Sam68	1,79	0,22
IP-IgG	1,31	0,98

	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT-3	24,52	25,15	25,23	25,09	25,37	24,92
IP-H	24,42	24,35	24,73	24,53	24,41	24,19
IP-IgG	35,88	36,12	34,24	35,23	35,86	36,54

FOLD CHANGE and st.dev

IP-H	1,27	0,45
IP-IgG	1,04	0,83

IP-Assay # 3

Ct SYBR	cDNA-Primer 3-REV, PCR-Primers 3-REV + 8-FWD					
	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT 1	26,35	26,64	26,38	26,75	27,07	26,84
IP-A1	26,15	26,46	26,52	26,17	25,96	26,58
IP-F	26,945	26,85	26,55	25,72	26,66	26,61
FOLD CHANGE and st.dev						
IP-A1	1,53	0,46				
IP-F	1,95	0,71				

	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT-2	26,14	26,23	26,04	26,18	26,34	26,22
IP-Sam68	26,68	26,31	26,56	26,4	26,52	26,67

FOLD CHANGE and st.dev

IP-Sam68	1,08	0,20
----------	------	------

	CTRL	CTRL	CTRL	OXALIP	OXALIP	OXALIP
INPUT-3	26,45	26,2	26,155	26,925	26,18	26,025
IP-H	26,305	26,1	26,265	26,42	26,33	26,195

FOLD CHANGE and st.dev

IP-H	1,06	0,38
------	------	------

SUPPLEMENTARY TABLE S2

PSI-AVERAGE Gene	CTRL	siA1/A2	OXA	OXA-siA1/A2	St.dev CTRL	siA1/A2	OXA	OXA-siA1/A2	Gene	cut-off ΔPSI: > 10 , P value < 0.05 ΔPSI(OXA1-CTRL)			Gene	cut-off ΔPSI: > 5 , P value < 0.05 ΔPSI(siA1/A2-CTRL)			Gene	cut-off ΔPSI: > 5 , P value < 0.05 ΔPSI(siA1/A2-OXA1)-(CTRL-OXA1)			st.dev	P values	
										st.dev	P values	st.dev		P values	st.dev	P values							
LGALS9	43,610	100,000	75,213	88,570	6,243	0,000	6,833	9,797	LGALS9	31,602	9,255	0,018528	LGALS9	56,390	6,243	0,002573	LGALS9	13,358	11,944	0,38228	reconf		
CASP9	25,898	24,054	56,461	28,050	6,577	5,889	1,058	4,705	CASP9	30,564	6,661	0,008474	CASP9	-1,844	8,828	0,735816	CASP9	-28,412	4,823	0,00408	co-opt		
MAPK10	70,246	68,509	100,000	100,000	6,565	3,564	0,000	0,000	MAPK10	29,754	6,565	0,008929	MAPK10	-1,738	7,470	0,707606	MAPK10	0,000	0,000	#DIV/0!	co-opt		
KITLG	26,335	42,452	51,092	52,583	2,363	1,200	3,459	1,474	KITLG	24,757	4,189	0,000513	KITLG	16,117	2,650	0,00046	KITLG	1,491	3,760	0,52982	anti		
TNFRSF10B	48,163	56,078	71,543	62,232	2,404	1,385	1,223	1,800	TNFRSF10B	23,379	2,697	0,000115	TNFRSF10B	7,914	2,774	0,007812	TNFRSF10B	-9,310	2,177	0,00177	reconf		
F3	69,347	78,825	88,697	88,805	4,824	5,147	1,197	0,827	F3	19,351	4,971	0,002522	F3	9,478	7,054	0,080501	F3	0,108	1,455	0,90428	co-opt		
EXO1	15,792	13,737	32,454	20,177	1,942	0,306	2,529	1,190	EXO1	16,663	3,189	0,000826	EXO1	-2,055	1,966	0,144562	EXO1	-12,277	2,795	0,00160	anti		
CEP170	62,517	69,495	77,977	74,312	0,698	1,881	1,390	2,952	CEP170	15,460	1,555	0,000067	CEP170	6,978	2,007	0,003829	CEP170	-3,665	3,262	0,12358	same		
POG2	36,134	44,791	51,467	57,383	2,796	0,638	0,982	0,567	POG2	15,333	2,963	0,000858	POG2	8,657	2,868	0,006391	POG2	5,916	1,134	0,00083	same		
MCL1	79,351	63,440	93,877	81,377	1,264	1,284	0,718	1,952	MCL1	14,525	1,454	0,000065	MCL1	-15,911	1,802	0,000107	MCL1	-12,499	2,080	0,00048	same		
AURKA	7,160	11,991	19,098	17,525	3,356	3,786	0,984	1,391	AURKA	11,938	3,498	0,004099	AURKA	4,831	5,060	0,173504	AURKA	-1,573	1,704	0,18519	co-opt		
GTF2H2	9,848	9,166	20,871	15,812	0,373	0,358	0,478	0,719	GTF2H2	11,024	0,606	0,000006	GTF2H2	-0,681	0,517	0,084607	GTF2H2	-5,059	0,863	0,00053	co-opt		
CHEK1	75,816	89,218	85,586	92,141	1,674	2,172	1,326	0,422	CHEK1	9,770	2,136	0,001373	CHEK1	13,403	2,742	0,001067	CHEK1	6,555	1,391	0,00123	same		
AURKB	48,173	35,887	56,310	37,592	5,441	3,272	5,370	5,611	AURKB	8,137	7,645	0,326121	AURKB	-12,286	6,349	0,068546	AURKB	-18,718	7,767	0,11678	co-opt		
BCL2L1	42,471	53,834	49,422	63,933	1,636	5,958	1,197	5,074	BCL2L1	6,951	2,027	0,004031	BCL2L1	11,363	6,179	0,033367	BCL2L1	14,511	5,214	0,00852	co-opt		
FOXN1	42,142	36,532	46,749	40,320	1,532	1,973	0,554	1,345	FOXN1	4,607	1,629	0,008056	FOXN1	-5,610	2,498	0,017699	FOXN1	-6,428	1,455	0,00157	anti		
MLH3	58,751	62,053	59,355	69,408	3,016	5,432	1,413	3,173	MLH3	0,603	3,331	0,769438	MLH3	3,302	6,213	0,409427	MLH3	10,054	3,473	0,00742	co-opt		
ARID4B	69,080	65,623	66,699	49,334	5,209	1,545	3,060	3,261	ARID4B	-2,382	6,041	0,715100	ARID4B	-3,458	5,433	0,463101	ARID4B	-17,365	4,472	0,04116	co-opt		
AXIN1	20,347	15,384	17,243	25,478	1,217	13,360	2,101	2,897	AXIN1	-3,104	2,428	0,091257	AXIN1	-4,963	13,416	0,556532	AXIN1	8,234	3,579	0,01633	co-opt		
BNIP1	3,570	0,000	0,000	0,000	6,184	0,000	0,000	0,000	BNIP1	-3,570	6,184	0,373901	BNIP1	-3,570	6,184	0,373901	BNIP1	0,000	0,000	#DIV/0!	co-opt		
FASTK	78,968	66,095	74,578	69,149	2,937	2,407	2,387	6,902	FASTK	-4,391	3,785	0,159573	FASTK	-12,873	3,797	0,01224	FASTK	-5,429	7,303	0,26731	co-opt		
CASC4	23,676	29,598	19,135	32,086	2,044	0,925	0,080	1,596	CASC4	-4,541	2,045	0,018375	CASC4	5,922	2,243	0,010243	CASC4	12,951	1,598	0,00015	co-opt		
FANCA	58,004	62,350	51,981	52,145	1,062	0,881	1,191	1,890	FANCA	-6,024	1,596	0,002827	FANCA	4,345	1,380	0,005492	FANCA	0,164	2,234	0,90490	co-opt		
BCLAF1	93,920	89,841	86,440	93,559	5,286	2,120	2,500	5,582	BCLAF1	-7,480	5,847	0,002969	BCLAF1	-4,079	5,695	0,060924	BCLAF1	7,120	6,116	0,01158	co-opt		
AKIP1	41,131	38,003	32,354	34,174	3,855	1,405	1,721	2,730	AKIP1	-8,777	4,222	0,067415	AKIP1	-3,128	4,103	0,419141	AKIP1	1,820	3,227	0,38399	co-opt		
BCLAF1	54,510	50,640	44,826	40,683	2,425	0,914	0,935	1,331	BCLAF1	-9,684	2,599	0,091035	BCLAF1	-3,870	2,592	0,282603	BCLAF1	-4,143	1,626	0,11398	co-opt		
CDC25B	78,529	78,095	67,580	76,446	1,156	0,969	1,709	0,402	CDC25B	-10,949	2,063	0,000778	CDC25B	0,375	1,508	0,68862	CDC25B	8,866	1,755	0,00094	co-opt		
ESYT2	16,894	14,592	5,342	5,470	0,376	1,235	0,337	0,383	ESYT2	-11,553	0,505	0,000002	ESYT2	-2,302	1,291	0,366619	ESYT2	0,129	0,510	0,68468	co-opt		
UTRN	92,038	92,966	80,301	83,297	1,074	0,631	1,855	9,331	UTRN	-11,737	2,143	0,000690	UTRN	0,929	1,246	0,266151	UTRN	2,996	9,514	0,61446	co-opt		
RCC1	64,335	82,313	51,399	76,241	1,334	1,650	2,657	6,725	RCC1	-12,936	2,974	0,001662	RCC1	17,978	2,122	0,000125	RCC1	24,842	7,231	0,00400	co-opt		
ZWINT	81,455	78,438	67,979	68,440	1,464	1,956	0,626	0,205	ZWINT	-13,476	1,592	0,000126	ZWINT	-3,018	2,443	0,099155	ZWINT	0,461	0,658	0,29178	co-opt		
PCBP4	89,888	84,218	74,550	75,628	9,042	0,458	3,390	2,335	PCBP4	-15,337	9,657	0,051322	PCBP4	-5,670	9,054	0,339065	PCBP4	1,078	4,116	0,67368	co-opt		
NAP1L4	26,779	22,737	10,623	12,102	1,454	1,975	0,183	0,490	NAP1L4	-16,157	1,466	0,000044	NAP1L4	-4,043	2,453	0,046177	NAP1L4	1,479	0,523	0,00804	co-opt		
SPTAN1	39,097	53,250	18,730	41,677	0,000	1,576	0,260	0,499	SPTAN1	-20,367	0,260	0,000000	SPTAN1	14,153	1,576	1,25E-05	SPTAN1	22,947	0,562	0,00000	reconf		
SDCCAG8	83,464	87,892	62,197	83,003	#DIV/0!	3,318	6,020	1,178	SDCCAG8	-21,267	#DIV/0!	#DIV/0!	SDCCAG8	4,429	#DIV/0!	#DIV/0!	SDCCAG8	20,806	6,134	0,04082	co-opt		
TSSC4	79,365	78,241	58,081	57,229	7,823	3,346	2,607	3,830	TSSC4	-21,284	8,246	0,011068	TSSC4	-1,124	8,508	0,83017	TSSC4	-0,852	4,633	0,76612	co-opt		
RP11	30,610	27,846	5,536	10,281	1,404	1,024	0,467	0,829	RP11	-25,075	1,480	0,000008	RP11	-2,764	1,738	0,051106	RP11	4,745	0,952	0,00099	co-opt		
RBBP8	63,404	63,626	38,300	51,211	4,183	3,357	0,864	1,313	RBBP8	-25,104	4,272	0,000525	RBBP8	0,222	5,364	0,946235	RBBP8	12,911	1,572	0,00014	co-opt		
GPR137	82,608	80,450	55,988	65,834	3,461	2,652	1,597	4,427	GPR137	-26,619	3,812	0,000268	GPR137	-2,157	4,361	0,439854	GPR137	9,845	4,707	0,02230	co-opt		
CASP8	66,626	71,323	38,429	47,745	4,309	2,108	2,257	2,990	CASP8	-28,198	4,864	0,000553	CASP8	4,697	4,797	0,165129	CASP8	9,316	3,746	0,01258	co-opt		
KIF13A	36,958	39,435	6,435	19,824	1,464	3,096	6,151	3,589	KIF13A	-30,523	6,323	0,001119	KIF13A	2,477	3,424	0,278423	KIF13A	13,389	7,121	0,03119	co-opt		
SLIT2	36,714	53,495	0,000	52,980	2,835	2,542	0,000	3,766	SLIT2	-36,714	2,835	0,000023	SLIT2	16,781	3,808	0,001583	SLIT2	52,980	3,766	0,00002	co-opt		
INCENP	54,581	36,581	13,878	15,114	1,534	2,003	0,518	0,847	INCENP	-40,703	1,619	0,000002	INCENP	-18,001	2,523	0,001388	INCENP	1,235	0,993	0,09737	co-opt		
BRCA1	77,050	77,716	36,309	53,289	1,860	1,870	2,316	3,098	BRCA1	-40,740	2,971	0,000019	BRCA1	0,667	2,638	0,684097	BRCA1	16,980	3,868	0,00161	co-opt		
PPP3CB	81,948	82,689	39,221	75,239	0,949	0,589	5,240	2,738	PPP3CB	-42,728	5,326	0,000156	PPP3CB	0,741	1,117	0,314799	PPP3CB	36,018	5,912	0,00046	co-opt		
MAP2	54,002	72,290	8,031	26,518	2,116	2,959	0,273	0,317	MAP2	-45,971	2,134	0,000003	MAP2	18,288	3,638	0,003736	MAP2	18,488	0,418	0,00001	same		
BCL2L1	85,723	83,062	36,806	51,171	2,840	5,986	1,073	4,590	BCL2L1	-48,917	3,036	0,000092	BCL2L1	-2,661	6,625	0,611354	BCL2L1	14,364	4,714	0,00618	co-opt		
DOM3Z	71,019	52,746	12,718	15,606	6,505	5,080	2,167	2,791	DOM3Z	-58,300	6,856	0,000124	DOM3Z	-18,273	8,253	0,018541	DOM3Z	2,887	3,534	0,22997	anti		
CHEK2	100,000	100,000	38,574	48,420	0,000	0,000	1,595	4,417	CHEK2	-61,426	1,595	0,000000	CHEK2	0,000									

SUPPLEMENTARY TABLE S3

PSI-AVERAGE	St.dev								cut-off Φ PSI: > 10 , P value < 0.05				cut-off Δ PSI: > 5 , P value < 0.05				cut-off Δ PSI: > 5 , P value < 0.05				
	Gene	CTRL	siSAM68	OXA	OXA-siSAM68	CTRL	siSAM68	OXA	OXA-siSAM68	Gene	Φ PSI(OXALI-CTRL)	st.dev	P values	Gene	Φ PSI(siSAM68-CTRL)	st.dev	P values	Gene	Φ PSI(siSAM68-OXALI)-(CTRL-OXALI)	st.dev	P values
LGALS9	29,748	55,538	66,252	94,387	24,330	19,928	9,984	9,722	LGALS9	36,505	24,094	0.224893	LGALS9	25,790	31,156	0.440022	LGALS9	28,135	13,521	0.197008	
TNFRSF10B	39,519	42,733	69,019	51,231	1,781	0,887	0,555	0,701	TNFRSF10B	29,500	1,865	0.000011	TNFRSF10B	3,215	1,989	0.048867	TNFRSF10B	-17,787	0,894	0.000004	co-opt
POGZ	31,186	28,878	52,763	47,133	3,253	1,370	1,438	3,707	POGZ	21,577	3,557	0.000464	POGZ	-2,308	3,530	0.320680	POGZ	-5,630	3,976	0.070229	
CEP170	56,504	66,836	76,201	74,675	2,186	2,154	0,711	1,125	CEP170	19,697	2,298	0.000120	CEP170	10,331	3,069	0.004310	CEP170	-1,526	1,331	0.118002	anti
KITLG	24,014	31,294	40,968	52,648	0,929	1,486	1,301	2,869	KITLG	16,953	1,599	0.000052	KITLG	7,280	1,753	0.001979	KITLG	11,681	3,151	0.003023	same
F3	69,338	65,017	85,202	77,709	8,555	5,600	2,585	4,630	F3	15,864	8,937	0.037132	F3	-4,321	10,225	0.504750	F3	-7,493	5,302	0.070629	
MCL1	77,466	73,088	93,196	92,617	0,073	0,594	0,487	0,645	MCL1	15,731	0,493	0.000001	MCL1	-4,378	0,598	0.000223	MCL1	-0,580	0,808	0.282180	anti
CASP9	34,253	21,132	49,273	61,878	2,143	1,255	4,957	5,951	CASP9	15,020	5,401	0.000852	CASP9	-13,122	2,484	0.000792	CASP9	12,604	7,745	0.047894	reconf
AURKA	5,846	5,536	20,686	18,826	5,128	0,807	1,444	0,663	AURKA	14,840	5,327	0.008493	AURKA	-0,310	5,191	0.922534	AURKA	-1,860	1,589	0.112496	
EXO1	17,132	17,678	31,363	37,821	0,958	1,525	1,178	0,753	EXO1	14,231	1,518	0.000084	EXO1	0,547	1,801	0.626727	EXO1	6,459	1,398	0.001322	co-opt
BCL2L1	39,097	36,762	53,293	58,571	2,252	5,346	3,417	0,280	BCL2L1	14,196	4,092	0.003862	BCL2L1	-2,335	5,802	0.524107	BCL2L1	5,278	3,428	0.056004	
GTTF2H2	8,079	7,591	19,169	18,593	0,391	0,930	0,952	0,906	GTTF2H2	11,090	1,029	0.000048	GTTF2H2	-0,488	1,009	0.449243	GTTF2H2	-0,576	1,314	0.489912	
CHEK1	79,399	78,521	83,517	83,130	2,552	1,926	1,927	1,293	CHEK1	4,118	3,198	0.089563	CHEK1	-0,878	3,197	0.659207	CHEK1	-0,387	2,321	0.787287	
FOXO1	40,999	26,567	44,259	36,414	0,652	1,234	1,233	2,150	FOXO1	3,260	1,395	0.015508	FOXO1	-14,432	1,396	0.000057	FOXO1	-7,845	2,478	0.005389	
CDC25A	87,432	59,642	86,448	59,458	21,769	1,213	23,472	0,915	CDC25A	-0,984	32,013	0.960112	CDC25A	-27,789	21,803	0.091865	CDC25A	-26,990	23,490	0.220717	
AXIN1	20,128	21,242	18,447	20,940	4,281	6,885	1,497	1,720	AXIN1	-1,681	4,535	0.652481	AXIN1	1,114	8,108	0.855194	AXIN1	2,493	2,280	0.196261	
BCLAF1	48,031	48,599	44,908	47,195	1,507	0,353	1,396	1,265	BCLAF1	-3,124	2,054	0.057892	BCLAF1	0,567	1,547	0.560013	BCLAF1	2,287	1,883	0.103259	
BCLAF1	92,681	90,124	87,434	83,356	6,357	2,775	1,723	0,523	BCLAF1	-5,248	6,586	0.239655	BCLAF1	-2,558	6,936	0.557749	BCLAF1	-4,078	1,800	0.017205	
CASC4	24,519	23,558	18,695	17,187	0,933	0,768	0,635	0,772	CASC4	-5,825	1,129	0.000866	CASC4	-0,961	1,208	0.240338	CASC4	-1,507	0,999	0.059262	
AKIP1	42,796	49,510	34,640	37,691	1,372	3,695	2,385	3,545	AKIP1	-8,156	2,752	0.006819	AKIP1	6,715	3,941	0.041931	AKIP1	3,051	4,273	0.283777	
ARID4B	73,053	75,063	64,275	71,380	4,199	1,921	9,967	1,204	ARID4B	-8,778	10,815	0.232475	ARID4B	2,010	4,617	0.492869	ARID4B	7,105	10,039	0.287485	
FASTK	75,403	73,020	65,992	76,719	2,395	3,097	8,165	4,300	FASTK	-9,411	8,509	0.127906	FASTK	-2,383	3,915	0.351260	FASTK	10,728	9,228	0.114346	
RCC1	67,671	69,407	58,210	48,261	2,756	1,500	3,192	5,418	RCC1	-9,461	4,217	0.017756	RCC1	1,736	3,137	0.392024	RCC1	-9,949	6,289	0.051885	
PCBP4	88,006	73,103	78,019	64,981	1,743	9,267	0,623	0,472	PCBP4	-9,986	1,851	0.000731	PCBP4	-14,903	9,429	0.052039	PCBP4	-13,038	0,782	0.000009	co-opt
CDC25B	77,104	67,465	66,087	59,852	0,962	3,171	1,388	0,496	CDC25B	-11,017	1,688	0.000349	CDC25B	-9,639	3,313	0.007288	CDC25B	-6,235	1,474	0.001846	same
MLH3	72,984	68,761	61,548	63,156	8,233	8,149	2,664	6,709	MLH3	-11,436	8,653	0.083925	MLH3	-4,222	11,583	0.562074	MLH3	1,608	7,219	0.719229	
MAPK10	100,000	100,000	88,355	100,000	0,000	0,000	20,169	0,000	MAPK10	-11,645	20,169	0.373901	MAPK10	0,000	0,000	#DIV/0!	MAPK10	11,645	20,169	0.495025	
FANCA	64,308	61,767	52,325	60,579	1,936	4,718	3,098	3,088	FANCA	-11,983	3,653	0.004737	FANCA	-2,541	5,100	0.436909	FANCA	8,253	4,374	0.030843	co-opt
ESYT2	18,165	7,084	5,492	0,000	1,384	0,641	0,562	0,000	ESYT2	-12,673	1,494	0.000125	ESYT2	-11,081	1,525	0.000229	ESYT2	-5,492	0,562	0.000072	same
SDCCAG8	78,741	79,382	64,704	56,638	0,373	0,839	0,655	#DIV/0!	SDCCAG8	-14,037	0,754	0.001439	SDCCAG8	0,640	0,918	0.400537	SDCCAG8	-8,067	#DIV/0!	#DIV/0!	co-opt
AURKB	61,268	35,970	47,230	60,200	5,932	5,291	1,854	8,249	AURKB	-14,037	6,215	0.053289	AURKB	-25,298	7,949	0.016828	AURKB	12,970	8,455	0.128597	reconf
ZWINT	79,628	79,026	65,142	64,714	1,865	2,135	1,640	2,259	ZWINT	-14,486	2,484	0.000540	ZWINT	-0,603	2,835	0.731425	ZWINT	-0,428	2,792	0.803589	
UTRN	94,194	91,464	75,987	84,032	5,151	0,502	5,688	6,655	UTRN	-18,207	7,674	0.014741	UTRN	-2,730	5,176	0.412558	UTRN	8,045	8,755	0.186688	
SPTAN1	36,006	26,241	17,154	15,375	0,431	1,659	0,000	0,000	SPTAN1	-18,852	0,431	0.000000	SPTAN1	-9,765	1,714	0.000592	SPTAN1	-1,779	0,000	#DIV/0!	anti
NAP1L4	29,925	27,106	11,051	12,184	0,545	3,282	1,361	2,865	NAP1L4	-18,874	1,466	0.000024	NAP1L4	-2,818	3,327	0.216237	NAP1L4	1,133	3,171	0.569589	
TSSC4	82,962	90,848	62,080	70,935	0,181	8,326	3,381	2,329	TSSC4	-20,881	3,385	0.003688	TSSC4	7,887	8,328	0.293419	TSSC4	8,854	4,105	0.020192	co-opt
RP11	31,621	25,013	5,994	6,581	3,440	1,203	0,459	0,218	RP11	-25,627	3,471	0.000215	RP11	-6,608	3,645	0.034840	RP11	0,587	0,508	0.116213	anti
GPR137	82,295	78,633	56,138	54,873	7,451	6,932	5,941	3,107	GPR137	-26,157	9,530	0.021510	GPR137	-3,662	10,177	0.612009	GPR137	-1,265	6,705	0.760210	
RBBP8	63,007	54,510	35,963	29,693	1,446	1,204	1,046	0,551	RBBP8	-27,044	1,785	0.000013	RBBP8	-8,497	1,882	0.001442	RBBP8	-6,270	1,182	0.000780	same
CASP8	79,049	66,312	44,383	39,172	0,069	3,219	1,398	2,267	CASP8	-34,666	1,400	0.000060	CASP8	-12,736	3,219	0.013054	CASP8	-5,211	2,664	0.027573	same
PPP3CB	81,599	60,181	44,338	31,721	0,749	1,153	4,898	1,223	PPP3CB	-37,261	4,955	0.000201	PPP3CB	-21,418	1,374	0.000011	PPP3CB	-12,617	5,375	0.015276	same
KIF13A	45,458	27,584	7,083	5,495	4,837	2,829	3,028	1,229	KIF13A	-38,376	5,707	0.000311	KIF13A	-17,874	5,604	0.005242	KIF13A	-1,588	3,268	0.447372	anti
SLIT2	41,083	26,883	0,000	8,692	1,157	2,435	0,000	7,800	SLIT2	-41,083	1,157	0.000000	SLIT2	-14,200	2,695	0.000800	SLIT2	8,692	7,800	0.125787	anti
BRCA1	80,787	81,833	35,867	47,852	3,330	2,496	1,933	3,479	BRCA1	-44,921	3,851	0.000035	BRCA1	1,046	4,162	0.685887	BRCA1	11,985	3,980	0.006446	co-opt
INCENP	62,232	25,957	14,198	8,401	1,062	0,307	0,732	0,162	INCENP	-48,034	1,290	0.000000	INCENP	-36,275	1,106	0.000001	INCENP	-5,797	0,750	0.000180	anti
MAP2	59,500	37,482	9,776	8,735	0,436	2,862	1,056	0,711	MAP2	-49,723	1,143	0.000010	MAP2	-22,018	2,895	0.001972	MAP2	-1,042	1,273	0.229436	anti
BCL2L1	80,840	74,719	29,411	55,723	5,463	1,717	4,740	4,399	BCL2L1	-51,429	7,233	0.000250	BCL2L1	-6,121	5,727	0.137781	BCL2L1	26,311	6,466	0.002137	co-opt
DOM3Z	71,169	69,151	15,868	24,522	0,623	2,512	2,087	0,713	DOM3Z	-55,302	2,178	0.000002	DOM3Z	-2,018	2,588	0.248199	DOM3Z	8,654	2,205	0.002448	co-opt
CHEK2	100,000	100,000	43,188	60,176	0,000	0,000	2,985	5,086	CHEK2	-56,812	2,985	0.000005	CHEK2	0,000	0,000	#DIV/0!	CHEK2	16,989	5,897	0.007543	co-opt

SUPPLEMENTARY TABLE S4

PSI-AVERAGE				ST.dev				cut-off Φ PSI: > 10				cut-off Δ PSI: > 5 , P value < 0.05				cut-off Δ PSI: > 5 , P value < 0.05				
Gene	CTRL	siRSF10	OXA	OXA-siRSF10	CTRL	siRSF10	OXA	OXA-siRSF10	Gene	Φ PSI(OXA)-CTRL	st.dev	P values	Gene	Φ PSI(siRSF10-CTRL)	st.dev	P values	Gene	Φ PSI(siRSF10-OXA)-[CTRL-OXA (I)]	st.dev	P values
TNFRSF10B	48,168	47,178	69,773	62,300	2,526	1,935	0,706	0,388	TNFRSF10B	21,604	2,623	0,000140	TNFRSF10B	-0,990	3,182	0,618470	TNFRSF10B	-7,473	0,8054	0,000088
CASP9	40,734	55,601	55,243	69,129	5,082	5,489	4,400	6,728	CASP9	14,509	6,722	0,020143	CASP9	14,867	7,480	0,026238	CASP9	13,886	8,0392	0,040269
MCL1	85,801	81,784	94,283	90,820	1,058	1,463	0,191	0,601	MCL1	8,482	1,075	0,000166	MCL1	-4,017	1,806	0,018252	MCL1	-3,463	0,6302	0,000681
GTF2H2	12,524	8,027	19,852	14,725	0,816	1,938	1,314	0,481	GTF2H2	7,328	1,547	0,001201	GTF2H2	-4,497	2,102	0,020752	GTF2H2	-5,128	1,3989	0,003153
AURKA	9,370	7,784	16,332	14,419	1,053	1,157	0,526	0,293	AURKA	6,962	1,177	0,000512	AURKA	-1,586	1,565	0,154059	AURKA	-1,913	0,6024	0,005321
AURKB	54,012	59,842	60,633	69,988	4,398	4,130	5,516	6,726	AURKB	6,622	7,054	0,179320	AURKB	5,831	6,033	0,169429	AURKB	9,355	8,6985	0,135968
EXO1	18,726	16,991	24,585	27,020	0,555	1,141	1,109	0,550	EXO1	5,859	1,241	0,001216	EXO1	-1,735	1,269	0,077017	EXO1	2,435	1,2382	0,027126
CHEK1	77,992	86,924	83,220	92,676	1,553	1,528	1,684	0,315	CHEK1	5,229	2,291	0,016776	CHEK1	8,933	2,179	0,002077	CHEK1	9,456	1,7136	0,000669
BAX	91,223	92,019	96,129	96,726	2,082	1,791	1,062	1,323	BAX	4,906	2,337	0,022047	BAX	0,796	2,746	0,642049	BAX	0,597	1,6971	0,574947
CDKN1A	0,000	0,000	0,323	1,009	0,000	0,000	0,559	0,111	CDKN1A	0,323	0,559	0,373901	CDKN1A	0,000	0,000	#DIV/0!	CDKN1A	0,686	0,5703	0,105781
AKAP13	0,475	0,890	0,796	0,972	0,478	0,428	0,134	0,017	AKAP13	0,320	0,497	0,326775	AKAP13	0,414	0,642	0,326214	AKAP13	0,176	0,1348	0,086761
CDK1	97,514	97,345	97,277	98,065	0,559	0,195	0,373	0,137	CDK1	-0,237	0,672	0,574070	CDK1	-0,168	0,592	0,647727	CDK1	0,789	0,397	0,026265
CDK2	98,582	98,185	97,962	98,069	0,443	0,156	0,155	0,062	CDK2	-0,620	0,469	0,084037	CDK2	-0,397	0,470	0,216825	CDK2	0,107	0,1668	0,330514
BCLAF1	59,925	2,519	58,282	1,410	3,635	1,188	12,012	1,342	BCLAF1	-1,643	12,550	0,831718	BCLAF1	-57,406	3,824	0,000013	BCLAF1	-56,871	12,087	0,001234
ITGB3BP	3,456	20,958	0,000	31,695	5,986	1,026	0,000	1,920	ITGB3BP	-3,456	5,986	0,373901	ITGB3BP	17,502	6,074	0,007538	ITGB3BP	31,695	1,9203	0,000009
CHEK2-2	97,303	97,118	93,620	95,814	0,261	0,097	1,756	0,520	CHEK2-2	-3,683	1,775	0,022889	CHEK2-2	-0,185	0,278	0,313575	CHEK2-2	2,194	1,8312	0,106655
RAD17	95,538	93,442	91,448	91,386	1,333	0,315	0,716	1,458	RAD17	-4,090	1,513	0,009443	RAD17	-2,095	1,370	0,057055	RAD17	-0,062	1,6247	0,950845
APAF1	62,624	55,931	58,116	54,992	7,779	4,280	2,697	3,411	APAF1	-4,508	8,234	0,396638	APAF1	-6,693	8,879	0,261705	APAF1	-3,123	4,3485	0,281411
CDC25A	63,721	63,035	58,607	61,623	1,054	0,520	1,516	0,670	CDC25A	-5,114	1,846	0,008665	CDC25A	-0,686	1,175	0,369193	CDC25A	3,016	1,6574	0,034442
AXIN1	17,509	19,955	11,689	12,881	1,142	4,447	2,158	2,122	AXIN1	-5,820	2,441	0,014503	AXIN1	2,446	4,591	0,408353	AXIN1	1,192	3,0264	0,532554
FASTK	84,327	88,941	77,901	77,839	0,218	0,842	1,340	1,775	FASTK	-6,427	1,358	0,001205	FASTK	4,614	0,870	0,000779	FASTK	-0,062	2,2241	0,964097
CDK25B	68,219	73,237	61,499	66,785	0,232	0,301	1,716	0,908	CDK25B	-6,719	1,732	0,002552	CDK25B	5,019	0,380	0,000022	CDK25B	5,286	1,9416	0,009204
CASC4	27,677	30,583	20,571	23,975	1,525	1,026	0,695	1,050	CASC4	-7,106	1,676	0,001832	CASC4	2,906	1,839	0,052043	CASC4	3,403	1,2589	0,009430
AKIP1	31,375	36,311	23,859	28,001	1,392	1,810	1,266	1,861	AKIP1	-7,516	1,882	0,002292	AKIP1	4,936	2,283	0,020043	AKIP1	4,142	2,2505	0,033289
ARID4B	21,731	11,572	14,028	18,836	0,428	4,150	2,484	1,327	ARID4B	-7,703	2,520	0,025744	ARID4B	-10,160	4,172	0,046573	ARID4B	4,809	2,8161	0,041656
PCBP4	80,686	85,773	72,848	83,086	2,419	4,238	2,347	2,855	PCBP4	-7,837	3,370	0,015756	PCBP4	5,088	4,879	0,145229	PCBP4	10,237	3,6954	0,008659
NAP1L4	20,797	27,897	6,892	15,675	1,019	2,748	0,584	1,406	NAP1L4	-13,904	1,174	0,000033	NAP1L4	7,100	2,931	0,013736	NAP1L4	8,783	1,5223	0,000563
ESYT2	24,689	23,736	9,951	12,114	0,845	1,627	1,856	1,073	ESYT2	-14,738	2,039	0,000234	ESYT2	-0,953	1,834	0,419078	ESYT2	2,163	2,1439	0,155443
SPTAN1	25,769	30,304	10,311	19,557	1,068	0,922	1,233	2,426	SPTAN1	-15,458	1,631	0,000081	SPTAN1	4,534	1,410	0,005097	SPTAN1	9,245	2,7219	0,004172
BCLAF1	49,333	34,068	33,654	27,474	0,316	5,195	1,612	3,183	BCLAF1	-15,679	1,642	0,000078	BCLAF1	-15,266	5,204	0,007077	BCLAF1	-6,181	3,5682	0,039932
MLH3	71,939	73,898	53,798	71,214	2,661	3,761	6,207	2,981	MLH3	-18,142	6,754	0,009643	MLH3	1,958	4,607	0,502464	MLH3	17,416	6,886	0,011868
SDCCAG8	80,291	77,694	59,167	58,575	3,116	2,721	1,975	3,038	SDCCAG8	-21,124	3,690	0,000581	SDCCAG8	-2,597	4,137	0,337997	SDCCAG8	-0,592	3,6239	0,791392
CASP8	54,469	57,051	30,998	36,249	1,126	0,452	0,518	2,244	CASP8	-23,472	1,240	0,000005	CASP8	2,582	1,214	0,021123	CASP8	5,251	2,3033	0,016835
RBBP8	68,838	75,950	44,809	62,272	1,439	1,173	1,928	1,295	RBBP8	-24,029	2,406	0,000066	RBBP8	7,112	1,857	0,002680	RBBP8	17,463	2,3227	0,000201
BRCA1	80,373	80,928	41,445	60,067	3,713	1,919	4,383	3,242	BRCA1	-38,928	5,744	0,000301	BRCA1	0,556	4,180	0,829185	BRCA1	18,622	5,4518	0,004087
BCL2L1	89,448	94,216	48,351	64,287	2,149	1,240	7,322	3,011	BCL2L1	-41,097	7,631	0,000735	BCL2L1	4,768	2,481	0,029128	BCL2L1	15,936	7,9167	0,025201
CHEK2	97,126	96,219	54,105	67,777	0,399	1,022	4,920	1,694	CHEK2	-43,021	4,936	0,000112	CHEK2	-0,908	1,097	0,225205	CHEK2	13,672	5,2031	0,010409
DOM3Z	82,989	80,912	20,822	27,076	1,106	2,483	1,288	2,512	DOM3Z	-62,167	1,697	0,000000	DOM3Z	-2,077	2,718	0,256214	DOM3Z	6,254	2,823	0,018501
	</																			

SUPPLEMENTARY TABLES5

Gene	Unit Name	Size of PCR products		Alternative event		Primer Name		Primer Sequence	
		S (bp)	L (bp)	size (bp)	type	Forward	Reverse	Forward	Reverse
AKIP1	C11orf17-F1 C11orf17-R1	252	333	81	exon cassette	C11orf17-F1	C11orf17-R1	CTCTAGAAAGTGTGGAGAG	GACCATTCCTATGTCCAAG
APAF1	APAF1-3 APAF1-4	768	897	129	exon cassette	APAF1-3	APAF1-4	GGACCTCAAGAGGATATG	GAAAGTACTGTCTGGTG
ARID4B	RBP1L1-F1 RBP1L1-R1	625	883	258	exon cassette	RBP1L1-F1	RBP1L1-R1	GAGGAGTACTGTAGATCAGC	TGGCATCAGTGAGATCCAG
AURKA	rs.AURKA.F1 rs.AURKA.R1	119	217	98	exon cassette	rs.AURKA.F1	rs.AURKA.R1	CCAGAGTCGGGGATATTGAT	TGCAGTTTCTTTAGATCGGTCCA
AURKB	AURKB.ec2.F1 AURKB_G_r	199	272	73	exon cassette	AURKB.ec2.F1	AURKB_G_r	CGGGGCGGGAGATTGAAAAGT	TGTGGCTGGACATTGGAGC
AXIN1	AXIN1-3 AXIN1-4	535	643	108	exon cassette	AXIN1-3	AXIN1-4	GAGGCTACTCAGAGAGTGT	CAGAAGTAGTACGCCAACAC
AXL	primer-1291 primer-1292	373	400	27	exon cassette	primer-1291	primer-1292	CCCCTGAGAACATTAGTGCT	AGAGCCAAGATGAGGACACA
BCL2L1	BCLX-3 BCLX-2	267	456	189	alternative 5'ss	BCLX-3	BCLX-2	ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG	TCATTTCCGACTGAAGAGTGA
BCL2L11	113317 BCL2L11-4	130	220	90	exon cassette	113317	BCL2L11-4	TACCTCCTACAGACAGAG	CCTCCTTGATAGTAAGCGT
BCLAF1	BCLAF1.u.f.6 BCLAF1.u.r.6	160	679	519	alternative 3'ss	BCLAF1.u.f.6	BCLAF1.u.r.6	CACCACAGAATGCTCCAAGA	GGGCTTCTCTCTGAAGGT
BCLAF1	NM_014739-3 NM_014739-4	479	626	147	exon cassette	NM_014739-3	NM_014739-4	GTACCTTGAGGAAGCATAC	AGTACCACGACCTCTCTCT
BNIP1	BNIP1-5 BNIP1-6	339	468	129	exon cassette	BNIP1-5	BNIP1-6	CCGGATCTGTAAACCAAGAG	CTTAAGAGATCTCTCCCTG
BRCA1	BRCA1-F2 BRCA1-R2	287	410	123	double exon cassette	BRCA1-F2	BRCA1-R2	GTCTCAGTGCCAACTCTCT	GTCACCTGTAGAGGATAGC
GPR137	C11ORF4.F3 C11ORF4.R3	124	274	150	exon cassette	C11ORF4.F3	C11ORF4.R3	ACTCCTGTTCGTCTATCTGC	TTGTCCCAAGTCATTCTAC
CASC4	NM_177974-F1 NM_177974-R1	241	409	168	exon cassette	NM_177974-F1	NM_177974-R1	CAACTGGACAACCTCTCTCT	CGCAGATCCATTGAAGCTC
CASP8	CASP8-3 CASP8-4	413	433	20	reciprocal exon cassette	CASP8-3	CASP8-4	CAGTAAAGGAGGAGATGG	GATGATCAGACAGTATCCCC
CASP9	primer-113212 primer-113213	360	670	310	alt. 5'ss +multiple exon cassette	primer-113212	primer-113213	TCTCTGTTAGGACACAG	GGACACAAAGATGTCCTGG
CDC25A	refseq_CDC25A.F1 refseq_CDC25A.R1	145	265	120	exon cassette	refseq_CDC25A.F1	refseq_CDC25A.R1	CGACCCAGATGAGAACAAGG	ATCGAGAAGTCCACGAAGC
CDC25B	refseq_CDC25B.F3 refseq_CDC25B.R3	101	224	123	exon cassette	refseq_CDC25B.F3	refseq_CDC25B.R3	GAGCAGTTTGCCATCAGACG	TCTGCGAGAGTGGGTG
CEP170	rs.CEP170.F1 rs.CEP170.R1	250	358	108	alternative 3'ss	rs.CEP170.F1	rs.CEP170.R1	CGCAGAAGCCATCATTAGAAGTG	TCGATGAGCAGTCCAATCTCGG
CHEK1	CHEK1.e.F1 CHEK1.e.R1	103	327	224	exon cassette	CHEK1.e.F1	CHEK1.e.R1	GACTGGGAGTCTGGTCAAAAC	TGCCATGAGTTGATGGAAGA
CHEK2	CHEK2.u.f.31 CHEK2.u.r.29	194	256	62	exon cassette	CHEK2.u.f.31	CHEK2.u.r.29	CAGCTCTCAATGTTGAACAGAA	CTGTGCTTTAAGTCAAGGTGT
GTF2H2	refseq_DKFZP686M0199.F1 refseq_DKFZP686	152	250	98	exon cassette	refseq_DKFZP686M0199.F1	refseq_DKFZP686M0199.R1	GTTGAATTCCTCGCTG	GTTCTTTCATCGCTCTCTCCC
DOM3Z	DOM3Z.e1.F1 DOM3Z.e1.R1	241	314	73	alternative 3'ss	DOM3Z.e1.F1	DOM3Z.e1.R1	ATAGTGAGCTGGCGGGGGCA	GAGAAGAGCAGAGGGTGGCTTC
ESYT2	FAM62B.U.1.F1 FAM62B.U.1.R1	124	187	63	exon cassette	FAM62B.U.1.F1	FAM62B.U.1.R1	TCAAAGCTGACAAAGACCAAGC	TGGACAACAGGATTTGGGTTC
EXO1	EXO1.ec1.F1 EXO1.ec1.R1	193	298	105	exon cassette	EXO1.ec1.F1	EXO1.ec1.R1	ACTATCGCACTCAGCCATTCTT	TGTAGCAATCCCTGTATCCCCA
F3	F3.F2 F3.R2	270	430	160	exon cassette	F3.F2	F3.R2	CTCGGACAGCCAACTTCA	CCACTCTGCTCTTCTACACTT
FANCA	FANCA.F13 FANCA.R13	102	227	125	exon cassette	FANCA.F13	FANCA.R13	AACCTGAAGCTGATGCTCTTTC	TATCTCTATTCTGTGGGG
FASTK	FAST_HUMAN-5 FAST_HUMAN-6	410	730	320	double exon cassette	FAST_HUMAN-5	FAST_HUMAN-6	CTGCTCTCTGCTCAGACCT	GGACCACTCTCTGTACAC
RP11-517H2.6	FGFR1OP.u.f.10 FGFR1OP.u.r.12	108	168	60	exon cassette	FGFR1OP.u.f.10	FGFR1OP.u.r.12	CCAAAGTCACAGAGGGGAAA	GCTCTTGGTCTTGACAAGG
FOXM1	refseq_FOXM1.F2 refseq_FOXM1.R2	100	145	45	exon cassette	refseq_FOXM1.F2	refseq_FOXM1.R2	CAGTGCCAAAGCTGACTTGA	GGGGAGTTGCGTTTGTATG
INCENP	rs.INCENP.F1 rs.INCENP.R1	107	119	12	exon cassette	rs.INCENP.F1	rs.INCENP.R1	CCGACCTCAGCCCCACGCGAG	CGCCCGAGATTCTCCAGGG
KIF13A	rs.KIF13A.F1 rs.KIF13A.R1	134	173	39	exon cassette	rs.KIF13A.F1	rs.KIF13A.R1	TGCCACTTATGGTTGAAGCCA	TGCATCTGACCACTCTCCCTT
KITLG	KITLG.u.f.9 KITLG.u.r.10	215	299	84	exon cassette	KITLG.u.f.9	KITLG.u.r.10	TGATGCCTTCAAGGACTTTGT	CTGCCCTTGAAGACTTGGC
LGALS9	LGALS9.F10 LGALS9.R6	135	231	96	exon cassette	LGALS9.F10	LGALS9.R6	GTGATGGTGAAACGGGATCCT	GTTGGCAGGCCACACGCG
LIG3	LIG3.u.f.1 LIG3.u.r.6	353	378	25	alternative 5'ss	LIG3.u.f.1	LIG3.u.r.6	CGGATTTAAAGAGACAGGCG	GTTGCTCAGCCATCTCACAG
MAP2	refseq_MAP2.F3 refseq_MAP2.R3	300	393	93	exon cassette	refseq_MAP2.F3	refseq_MAP2.R3	CAAGTTATTCTTCAAGCACACC	TGGATGTACATGGGCTTAGG
MAPK10	refseq_MAPK10.F1 refseq_MAPK10.R1	138	197	59	exon cassette	refseq_MAPK10.F1	refseq_MAPK10.R1	CAGAACCAAAACACATGCCAA	CGCTCATGCTTAATTCCTCT
MCL1	MCL1.F1 MCL1.R1	134	382	248	exon cassette	MCL1.F1	MCL1.R1	CCAAGGACACAAAGCCAATG	TGGAAGAACTCCACAAACCC
MLH3	refseq_MLH3.F1 refseq_MLH3.R1	153	225	72	exon cassette	refseq_MLH3.F1	refseq_MLH3.R1	CCCTATCGTTTACCAAAGG	TTTCCGACAGAGCCTTGT
NAP1L4	NAP1L4.e1.F2 NAP1L4.e1.R2	341	379	38	exon cassette	NAP1L4.e1.F2	NAP1L4.e1.R2	CGAGGAGGGGAGAGACGAGGAT	GAAAGTCAGAGCTCAGGCGAC
NDEL1	refseq_NDEL1.F2 refseq_NDEL1.R2	130	165	35	exon cassette	refseq_NDEL1.F2	refseq_NDEL1.R2	ACCAAGCATCACGAAAATCC	GGGCTCAAGCCGTTTACTGCG
PCBP4	PCBP4.ec1.F1 PCBP4.ec1.R1	188	317	129	exon cassette	PCBP4.ec1.F1	PCBP4.ec1.R1	GCAATAGTGGAAATGTCTCCAG	TGGTTGGCAGAGAGAAGAACAG
POGZ	refseq_POGZ.F1 refseq_POGZ.R1	200	359	159	exon cassette	refseq_POGZ.F1	refseq_POGZ.R1	ACCTGTTCTAGGAATGTGAGG	TGGTTGAGTAACCATTTGTCC
PPP3CB	PPP3CB.u.f.21 PPP3CB.u.r.22	117	147	30	exon cassette	PPP3CB.u.f.21	PPP3CB.u.r.22	ACAGGGATGTGCCTAGTGG	ATCCAAACCTTTGCTCTT
RBBP8	refseq_RBBP8.F1 refseq_RBBP8.R1	145	226	81	alternative 5'ss	refseq_RBBP8.F1	refseq_RBBP8.R1	AATGTGCTCTCGCTTACG	TGCTCCACACTCTTACTTGCTT
RCC1	rs.SNHG3-RCC1.F1 rs.SNHG3-RCC1.R1	103	246	143	exon cassette	rs.SNHG3-RCC1.F1	rs.SNHG3-RCC1.R1	AGGGTCTTTATAGAAAGGAGAGT	CTTCTTGCTTTTGGGGATGGCA
SDCCAG8	SDCCAG8-F1 SDCCAG8-R1	180	417	237	double exon cassette	SDCCAG8-F1	SDCCAG8-R1	GTGCTCGAGACTAACAGAAC	ATGCTCTCATGTACTCTCC
SLIT2	SLIT2.F36 SLIT2.R4	222	234	12	exon cassette	SLIT2.F36	SLIT2.R4	GGCAAGTTTCAACCATATGCC	GGAGCCATAATGACTGGTGAC
SPTAN1	SPTAN1.ec1.F1 SPTAN1.ec1.R1	308	368	60	exon cassette	SPTAN1.ec1.F1	SPTAN1.ec1.R1	GGTGGAAAGTGAAGTGAACGA	AACCTGCTCCAAGTCTGCTCC
TNFRSF10B	TNFRSF10B-3 TNFRSF10B-4	584	660	76	intron retention	TNFRSF10B-3	TNFRSF10B-4	CAGGACTATAGCATTCACTG	CTCTCTCTGAGACCTT
TSSC4	TSSC4.F10 TSSC4.R7	140	332	192	intron retention	TSSC4.F10	TSSC4.R7	TTGGCTGCTCAATCACACTC	ATGCTCTCAGATGGAATGG
UTRN	UTRN.u.f.81 UTRN.u.r.78	231	270	39	exon cassette	UTRN.u.f.81	UTRN.u.r.78	CAAAACCCCTCGATTGGTT	TGGCAACTACTGCTGGATGAG
ZWINT	refseq_ZWINT.F2 refseq_ZWINT.R2	234	375	141	alternative 5'ss	refseq_ZWINT.F2	refseq_ZWINT.R2	GGGAAGCCTTTGAGCAGC	TCCCCATGGTGTCTCTG

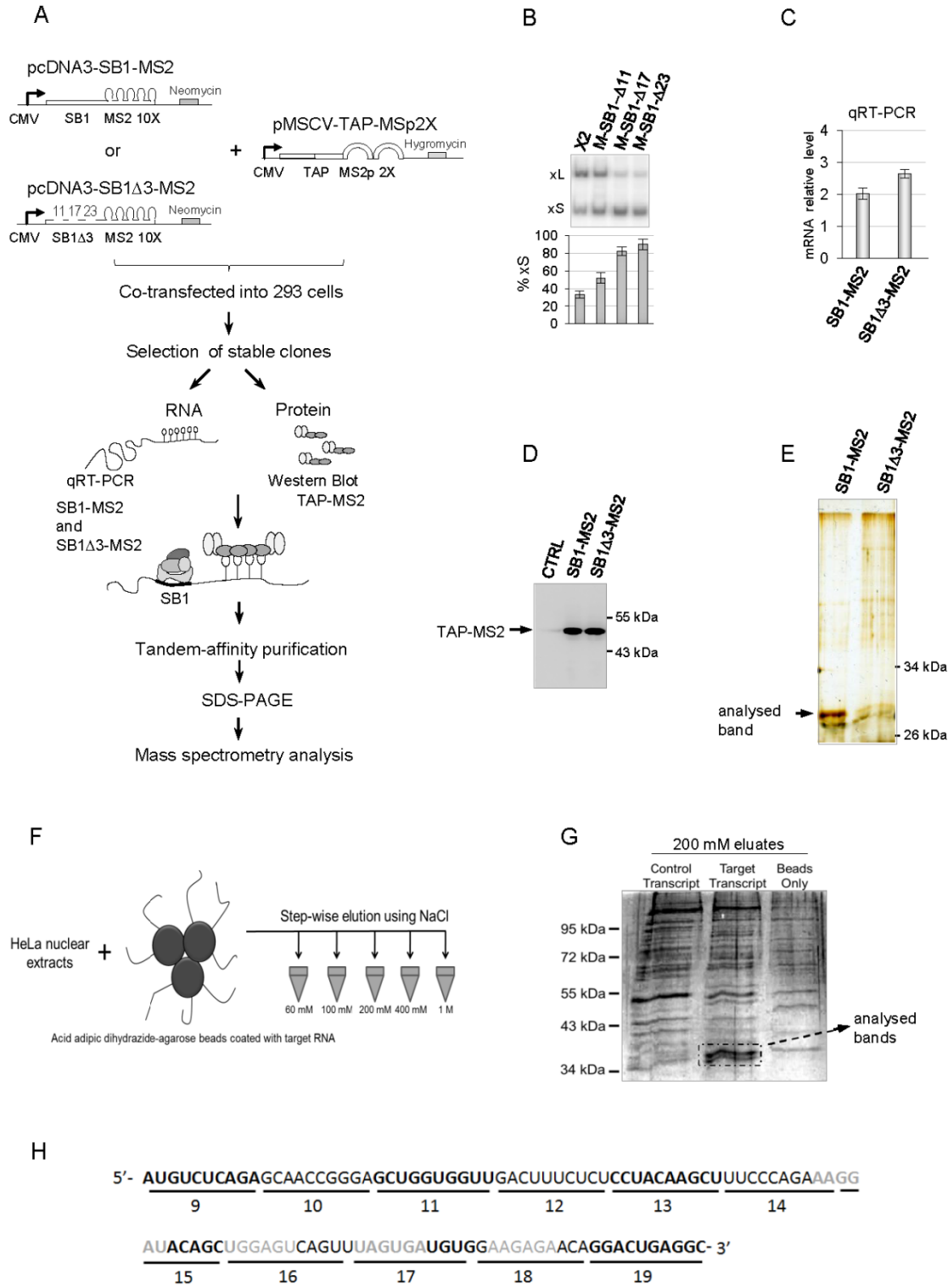


FIGURE S2

si A1/A2

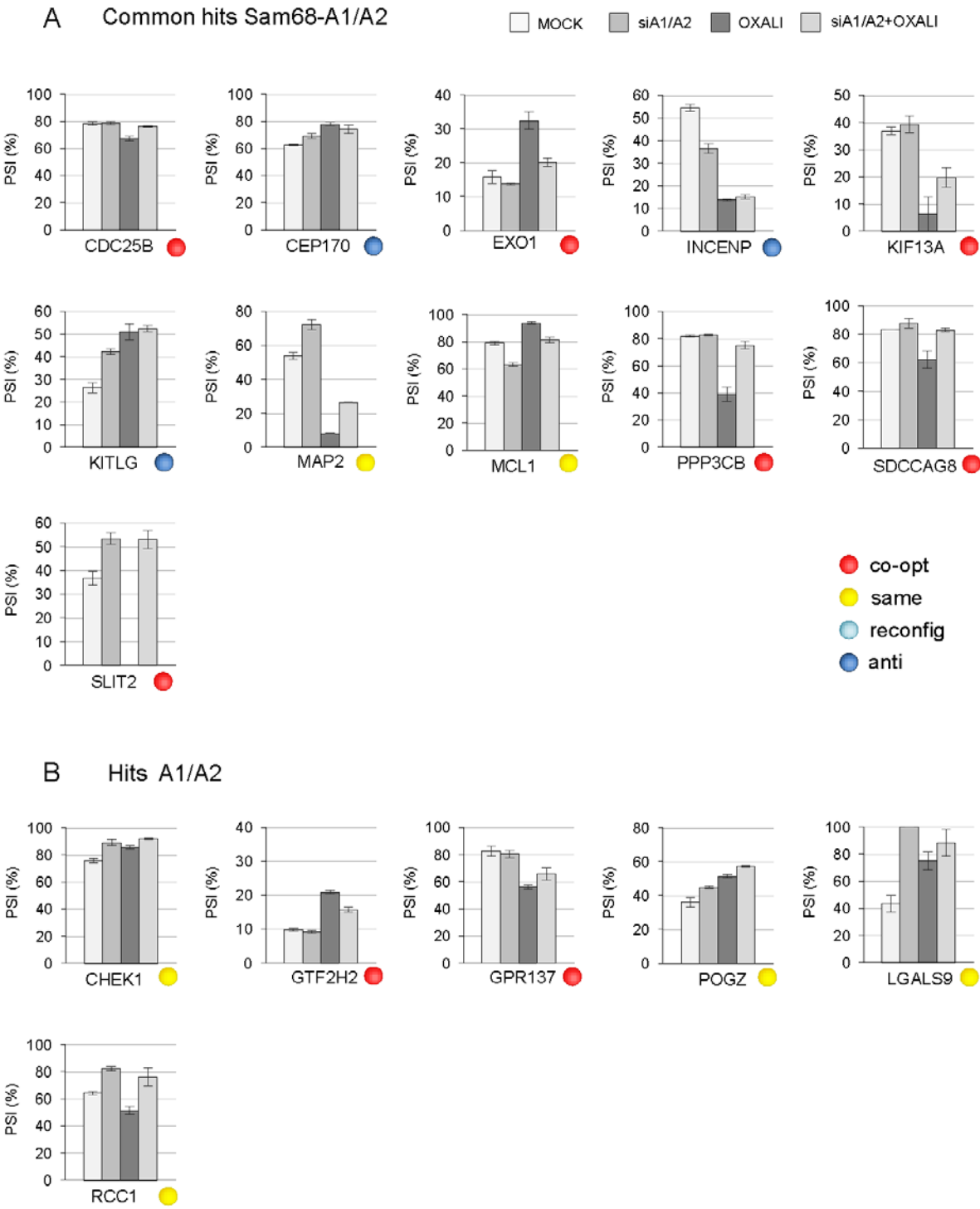


FIGURE S3

siSam68

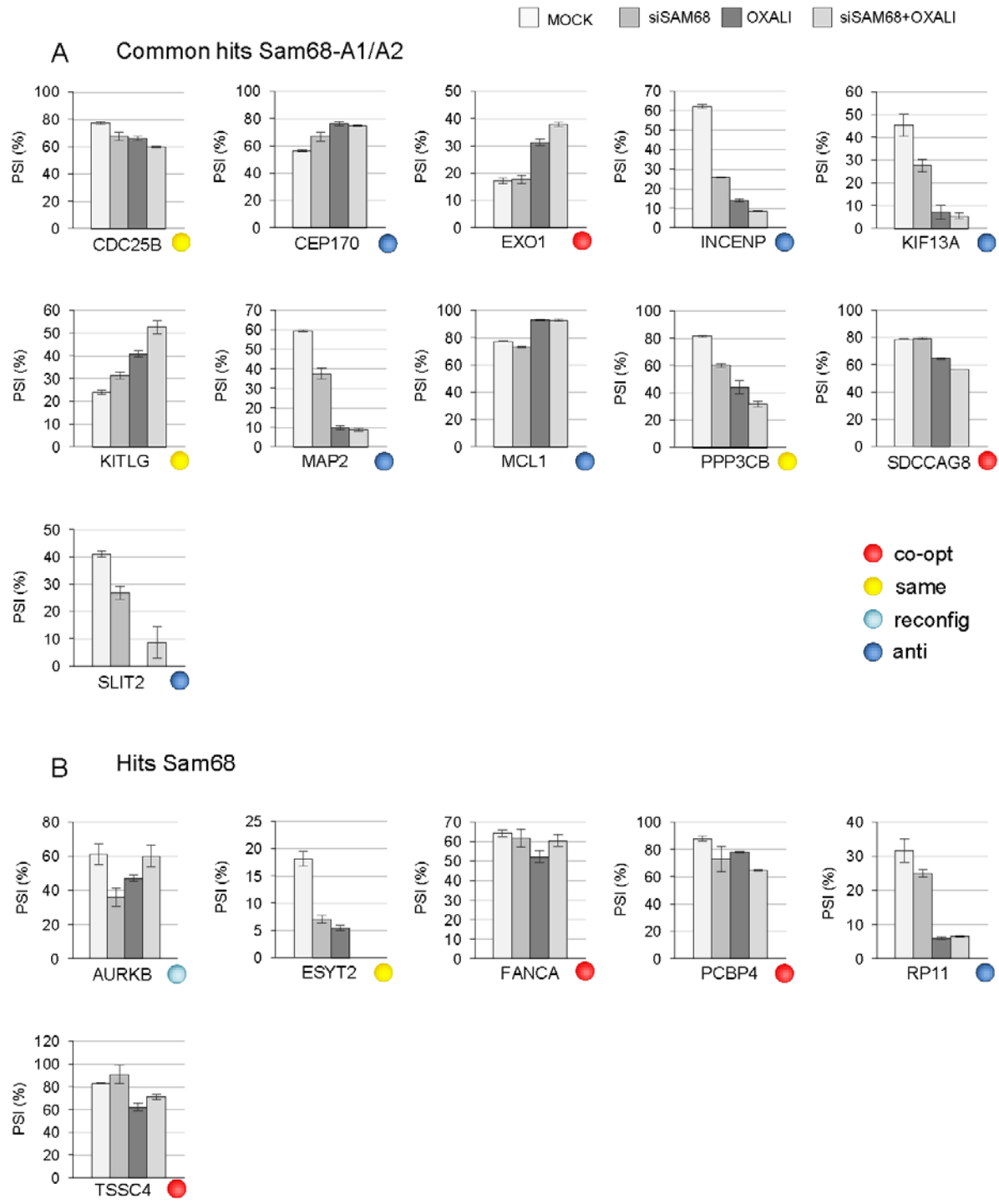


FIGURE S4

siSRSF10

MOCK siSRSF10 OXALI siSRSF10+OXALI

Common hits SRSF10-Sam68-A1/A2

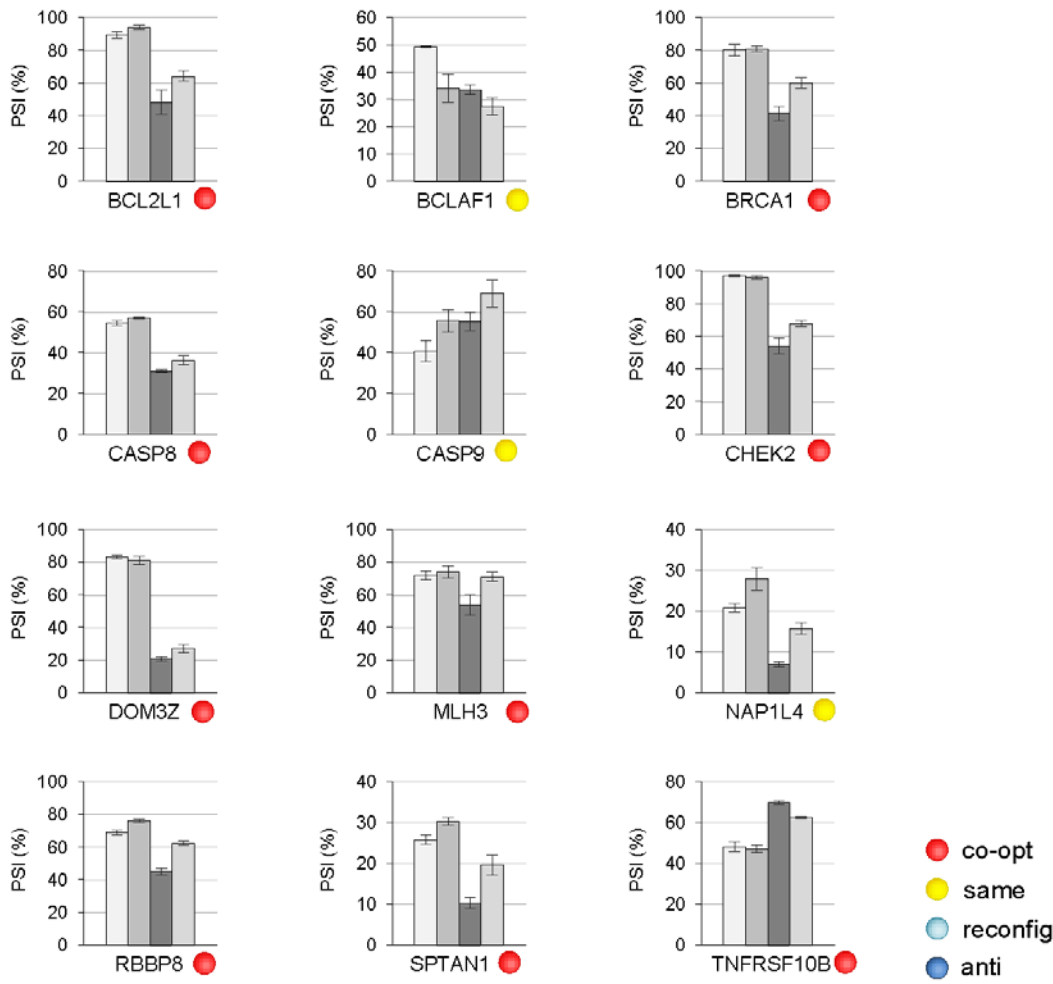


FIGURE S5

CHAPITRE II- hNRNP A1/A2 ET SAM68 SONT ESSENTIELS À UN CHANGEMENT DE L'ÉPISSAGE DE BCL-X SUSCITÉ PAR L'INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE PKC

Avant-propos : Les travaux effectués et présentés dans ce chapitre de la thèse furent effectués simultanément avec ceux présentés dans le chapitre précédent. Alors que les résultats représentées aux figures 1 et 2 découle de mes expériences personnelles, la liste d'unités présentées à la figure 3 est le produit d'un amalgame de travaux antérieurs effectués par M. Lulzim Shkreta (Ph.D.) et moi-même.

CHAPITRE II- INTRODUCTION

La répression de l'utilisation du site xS dans les cellules ECR-293 par la voie de signalisation de la protéine kinase C ou PKC fut découverte par l'utilisation de l'inhibiteur général de kinases staurosporine avec une haute affinité pour PKC (Ruegg and Burgess 1989; Revil et al. 2007) et de l'inhibiteur spécifique de la PKC calphostine C (Revil et al. 2007). Celle-ci est médiée principalement au travers du grand élément SB1 de 361 nt situé environ 150 nt en amont du site xS et correspondant approximativement à la première moitié du deuxième exon de Bcl-x (Fig. 1A). Cet impact de l'inactivation de la kinase PKC n'est observé que dans la lignée non transformée ECR293, possiblement dû au fait que cette voie est inactivée ou résistante aux inhibiteurs dans les cellules cancéreuses. Dans le cas de PKC, l'inhibition sélective des différentes isoformes de la kinase par l'utilisation d'inhibiteurs tels que Gö6976 (inhibe les isoformes PKC α , PKC β , et PKC μ ou PKD; reproduit l'effet de la staurosporine sur l'épissage de Bcl-x) et Gö6983 (inhibe l'isoforme PKC α) ou d'ARNi contre PKC α n'a permis de distinguer avec certitude l'isoforme responsable. Cependant, des essais de transplantabilité dans un contexte hétérologue de différentes régions de SB1 ont permis de confirmer d'abord que l'impact de PKC sur la régulation de l'épissage de Bcl-x passe au travers de liaison d'un facteur protéique d'identité inconnue et ensuite de restreindre la région modulant l'effet

au dernier deux tiers de l'élément (Revil et al. 2007). Les travaux présentés dans ce chapitre de la thèse visaient à isoler et caractériser le ou les facteurs protéiques modulant l'impact de la staurosporine sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x.

CHAPITRE II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les diverses techniques et méthodes employées dans ce chapitre ont été pour la plupart décrites dans l'article présenté au chapitre précédent. L'unique nouveauté concerne l'emploi de la staurosporine.

Transfections et traitement cellulaire

Les cellules ECR-293 (Invitrogen) ont été cultivées à 37°C (5% CO₂) dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Wisent) complété avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent) et 1% de glutamine (Wisent). La staurosporine a été obtenue de Calbiochem. Pour les transfections de minigènes, les cellules ECR-293 (2 X 10⁵) ont été aliquotées dans des puits de 35 mm². Après 48 heures, 1 µg d'ADN plasmidique et 5 µL de polyéthylèneimine (1 µg/µL) (Polysciences) ont été incubés pendant 20 minutes dans 200 µL d'Opti-MEM (volume final) avant d'être ajoutés aux puits qui contiennent 500 µL de DMEM. Quatre heures plus tard, 1,5 mL de DMEM avec ou sans 50 nM de staurosporine est ajouté à chacun des puits. Les cellules sont récoltées 18 heures après et l'ARN est extrait en utilisant du TRIzol (Invitrogen).

Pour la déplétion d'hnRNP A1/A2 et Sam68, les cellules ECR-293 sont transfectées, en utilisant de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), avec 80 nM d'un siARN spécifique à A1 (AAUGGGGAACGCUCACGGACUdTdT) et d'un siARN spécifique à A2 (AACCACAGAAGAAAGUUUGAGdTdT) ou avec un siARN spécifique à Sam68 (AUAUCAUCCAUAUAUCCGdTdT) achetés de chez IDT. Les cellules ECR-293 ont été traitées pendant 96 heures (sihnRNP A1/A2) ou 72 heures (Sam68). 22 heures avant la récolte, les cellules sont traitées avec ou sans 50 nM de staurosporine. Les protéines et l'ARN sont extraits pour la vérification de la déplétion par immunobuvardage de type Western et du profil d'épissage de Bcl-x endogène en effectuant un RT-PCR.

CHAPITRE II- RÉSULTATS

Dans le but de mieux caractériser et isoler la ou les régions importantes au sein de l'élément SB1 pour l'impact de la voie de signalisation de PKC ou de celle de la DDR sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x, nous avons effectué, tel que présenté dans le chapitre précédent, une série de transversions, délétions et substitutions couvrant l'élément SB1 10 nt à la fois. Cette mutagenèse intensive avait permis la découverte entre autres d'une région centrale répressive de 110 nt (Reg9-19) interrompue par un court activateur (Reg12) (Fig. 1B). Des portions de celle-ci correspondent au chevauchement de deux fragments de SB1 sensibles à la staurosporine identifiés lors des essais précédents de transplantabilité (Revil et al. 2007). L'insertion de cette région centrale répressive dans le minigène Δ SB1 à un site qui correspond approximativement à sa distance du site

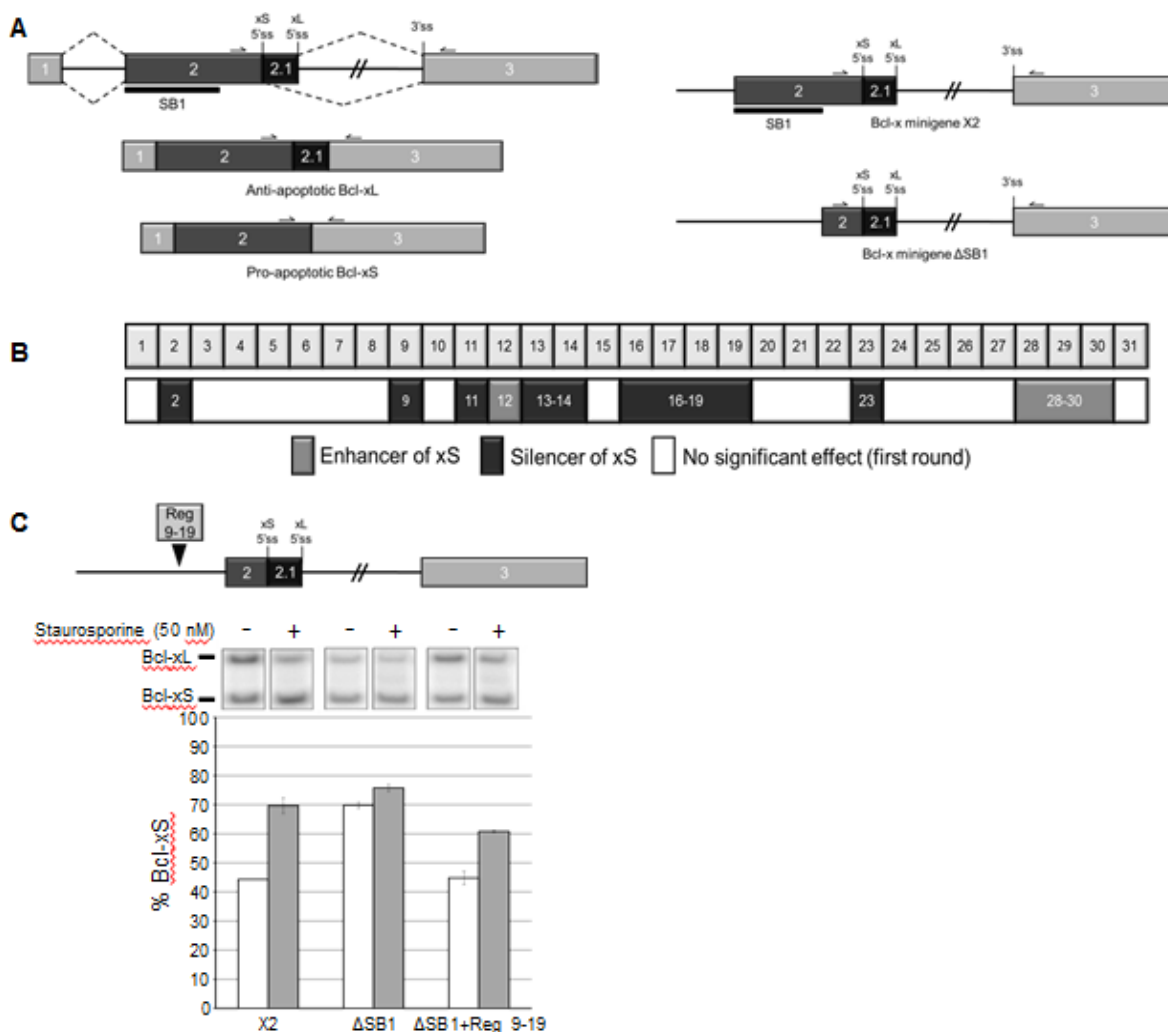


Figure 1 : La mutagenèse de l'élément SB1 révèle la présence de sous-régions activatrices et inhibitrices qui confèrent une réactivité à la voie de PKC. A. Représentation de la structure du gène Bcl-x et de ses deux isoformes majeures : l'isoforme longue anti-apoptotique Bcl-xL (produite par l'utilisation du site d'épissage 5' proximal) et l'isoforme courte pro-apoptotique Bcl-xS (produite par l'utilisation du site d'épissage 5' distal). L'élément SB1 correspond à la première moitié de l'exon 2 et agit globalement comme un répresseur de Bcl-xS. Les portions incluses dans les minigènes X2 et ΔSB1 sont montrées. Les positions des amorces utilisées dans les réactions de RT-PCR sont montrées. B. Compilation schématique des résultats de la mutagenèse exhaustive de l'élément SB1. C. Réactions de RT-PCR sur l'ARN total extrait de cellules ECR 293 transfectées avec les minigènes X2, ΔSB1 and ΔSB1+Reg 9-19. La sous-région SB1 a été insérée au site de restriction AscI dans le minigène ΔSB1, 279 nucléotides en amont du site d'épissage xS. 4 heures après la transfections, les cellules sont traitées avec ou sans 50 nM de staurosporine. Les cellules sont récoltées 24 heures post-transfection.

d'épissage 5' xS dans l'endogène restaure d'une part la répression de l'utilisation de ce site et d'autre part une réponse partielle à un traitement à la staurosporine (Fig. 1C). Ce résultat indique que Reg9-19 contribue à l'altération de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x médiée par l'inhibition de la PKC.

L'utilisation de cette région centrale sensible à la staurosporine comme cible dans une chromatographie d'affinité d'ARN avait permis de récupérer les protéines hnRNP A1 et A2/B1. Ces facteurs, en plus de la protéine Sam68 avec laquelle ils interagissent, sont essentiels à l'impact de l'activation de la voie de la DDR par l'oxaliplatine sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. Tel que présenté dans le précédent chapitre, la déplétion de ces protéines par interférence à l'ARN (siRNA) n'a qu'un impact peu significatif sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x, un résultat qui contraste beaucoup avec celui obtenu par l'équipe de Claudio Sette (Paronetto et al. 2007) (impact de moins de 10%), mais en accord avec ceux obtenus dans le passé par notre équipe dans diverses lignées cellulaires (Revil et al. 2007; Michelle et al. 2012). Nous avons testé, à l'instar de ce que nous avons effectué dans le cas de la DDR, si hnRNP A1/A2 et Sam68 jouaient un rôle important dans la levée de la répression du site xS exercée par la PKC par l'emploi de la staurosporine. La réduction du niveau d'expression de ces protéines par ARNi a compromis l'accroissement de la production de l'isoforme courte pro-apoptotique induit par un traitement à la staurosporine, suggérant qu'hnRNP A1/A2 et Sam68 sont primordiaux à la levée de cette répression médiée par PKC (Fig. 2A et 2B).

Nous nous sommes demandés par la suite si d'autres événements d'épissage réagissant à un traitement à la staurosporine dans les cellules ECR-293 sont régulés par hnRNP A1/A2 et Sam68 de la même manière que la situation présente pour Bcl-x. Nous avons identifié 23 événements d'épissage alternatifs issus de gènes impliqués dans l'apoptose cellulaire, la réparation de l'ADN et dans la régulation du cycle cellulaire qui subissent un changement de leur ratio d'épissage supérieur à 10% suite à un traitement à la staurosporine (Fig. 3). De ces événements réagissant à la staurosporine, 12 sont sensibles

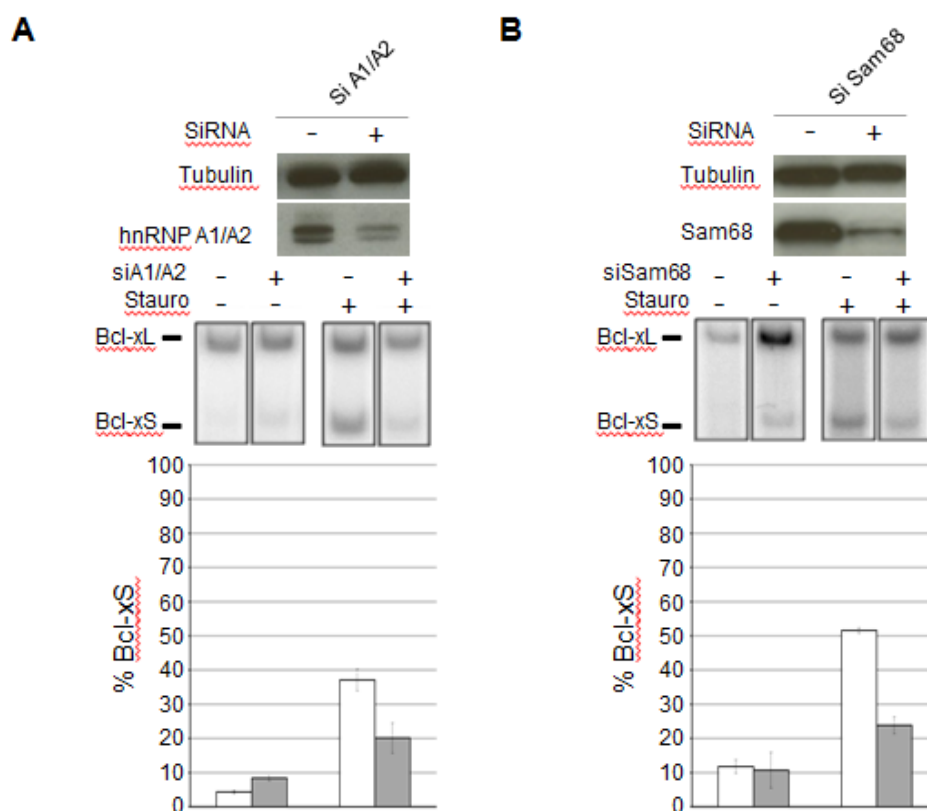


Figure 2: La déplétion d'hnRNP A1/A2 et Sam68 altère la modulation de l'épissage de Bcl-x par PKC. Essais de RT-PCR sur l'ARN total extrait de cellules ECR 293 transfectées avec (A) sihnRNP A1/A2 (96 heures) ou (B) siSam68 (72 heures). 22 heures avant la récolte, les cellules sont traitées avec ou sans 50 nM de staurosporine. L'analyse d'immunobuvardage de type Western montre le niveau relatif d'expression d'hnRNP A1/A2, de Sam68 et de la tubuline. La tubuline est utilisée comme contrôle. Les expériences ont été effectuées en triplicatas.

à la déplétion d'hnRNP A1/A2 (Fig. 3 et Tableau suppl. 1). 5 de ces 12 événements répondent à la déplétion d'hnRNP A1/A2 avec une amplitude similaire, que ce soit dans les cellules traitées ou pas à la staurosporine (FOXMI, MCL1, POGZ, SPTAN1 et MAP2 étiquetés comme *same* dans Tableau suppl. 1). Quatre autres événements sensibles à la

déplétion d'hnRNP A1/A2 dans les cellules non traitées perdent cette réactivité dans celles traitées à la staurosporine (KITLG, F3, INCENP et DOM3Z étiquetés comme *anti* dans Tableau suppl. 1). Finalement, les 3 derniers n'étaient pas affectés par la déplétion d'hnRNP A1/A2 dans les cellules non traitées acquièrent cette sensibilité dans celles

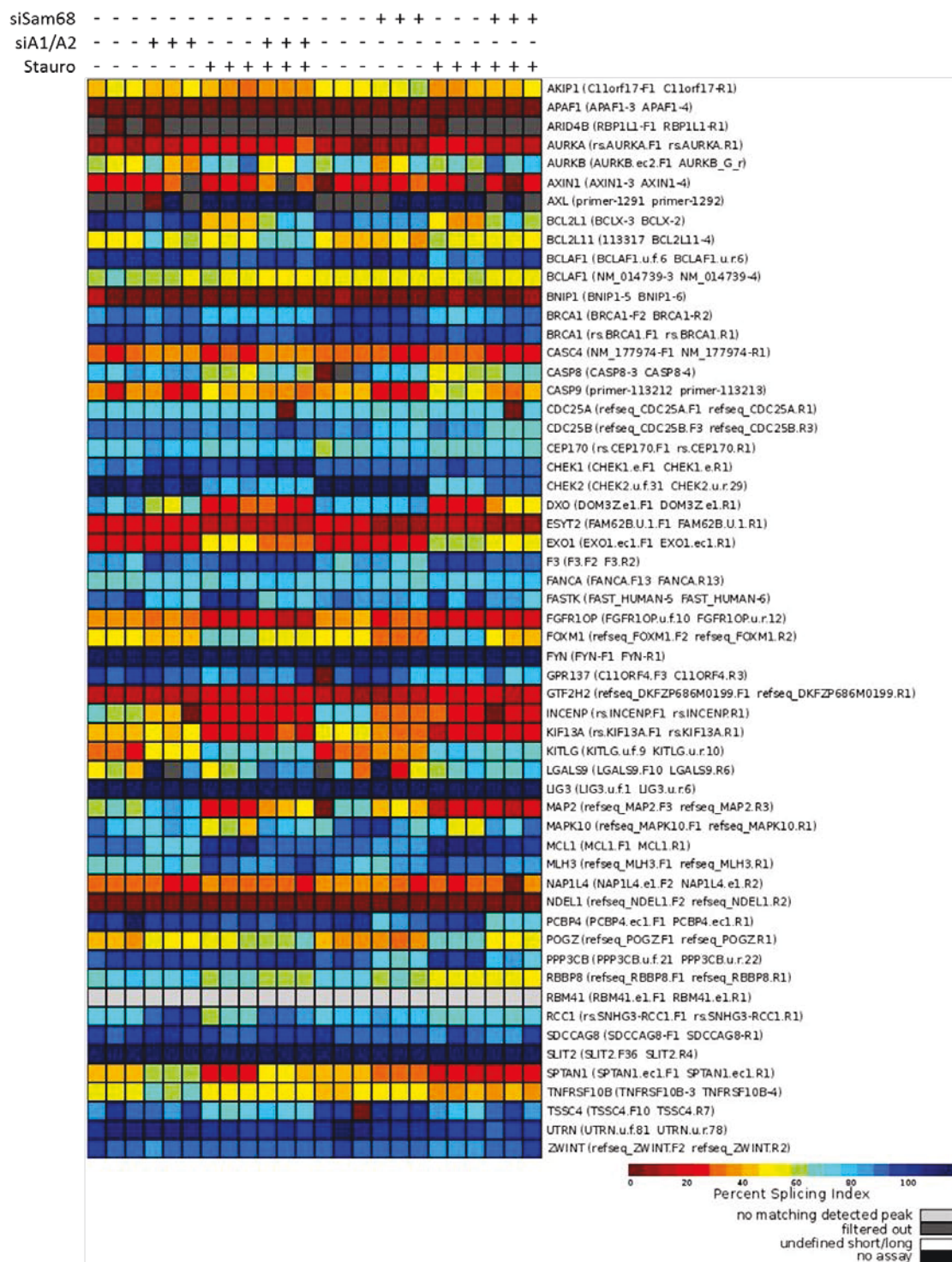


Figure 3: La déplétion d'hnRNP A1/A2 et Sam68 altère l'impact de PKC sur la régulation de l'épissage alternatif d'unités impliquées dans la régulation de l'apoptose, de la DDR et du cycle cellulaire. Essais de RT-PCR sur l'ARN total extrait de cellules ECR 293 transfectées avec sihnRNP A1/A2 (96 heures) ou siSam68 (72 heures). 22 heures avant la récolte, les cellules sont traitées avec ou sans 50 nM de staurosporine. Les expériences ont été effectuées en triplicatas.

traitées à la staurosporine (EXO1, MAPK10 et BCL2L1 étiquetés comme *co-opt* dans Tableau suppl. 1).

Dans le cas de Sam68, des 23 événements d'épissage alternatif, 19 sont sensibles à sa déplétion (Fig. 3 et Tableau suppl. 2). 2 de ces 19 événements répondent à la déplétion de Sam68 avec une amplitude similaire, que ce soit dans les cellules traitées ou pas à la staurosporine (KITLG et FOXMI étiquetés comme *same* dans Tableau suppl. 2). 6 autres événements qui étaient sensibles à la déplétion de Sam68 dans les cellules non traitées perdent cette réactivité dans celles traitées à la staurosporine (RBBP8, RP11, SPTAN1, KIF13A, INCENP et MAP2 étiquetés comme *anti* dans Tableau suppl. 2). Finalement, les 11 derniers n'étaient pas affectés par la déplétion de Sam68 dans les cellules non traitées acquièrent cette sensibilité dans celles traitées à la staurosporine (EXO1, POGZ, MCL1, F3, GTF2H2, AURKA, BCL2L11, BRCA1, BCLAF1, DOM3Z et BCL2L1 étiquetés comme *co-opt* dans Tableau suppl. 2). La quasi-totalité des unités sensibles à la staurosporine régulées par hnRNP A1/A2 sont aussi régulées par Sam68. La déplétion d'hnRNP A1/A2 et Sam68 interfère avec le changement de la régulation de l'épissage alternatif médié par la staurosporine au niveau des événements BCL2L1, EXO1 et INCENP, reflet d'une activité synergique ou additive de la part de ces deux facteurs d'épissage. Dans d'autres situations, une relation antagoniste entre hnRNP A1/A2 et Sam68 fut observé pour les événements SPTAN1, MAP2, POGZ, DOM3Z et F3.

PSI-AVERAGE				St.dev				cut-off ΔPSI: >100, P value <0.05				cut-off ΔPSI: >150, P value <0.05				cut-off ΔPSI: >150, P value <0.05					
Gene	CTRL	siA1/A2	STAURO	STAURO-siA1/A2	CTRL	siA1/A2	STAURO	STAURO-siA1/A2	Gene	ΔPSI(STAURO-CTRL)	St.dev	P values	Gene	ΔPSI(siA1/A2-CTRL)	St.dev	P values	Gene	ΔPSI(siA1/A2-STAURO)	St.dev	P values	
KITLG	26,335	42,452	62,921	60,672	2,363	1,200	3,062	1,529	KITLG	36,586	3,791	0,00004	KITLG	16,117	3,388	0,00023	KITLG	-2,249	3,727	0,15931	anti
EXO1	15,792	13,737	42,610	26,557	1,942	0,306	0,271	1,094	EXO1	26,818	2,093	0,00001	EXO1	-2,055	1,986	0,07228	EXO1	-16,054	1,146	0,00001	co-opt
MLH3	58,751	62,053	79,870	78,644	3,016	5,432	4,020	4,463	MLH3	21,119	7,034	0,00095	MLH3	3,302	7,433	0,20471	MLH3	-1,227	7,909	0,37071	
AURKB	49,041	45,871	65,914	50,848	7,395	17,392	9,451	9,425	AURKB	20,682	16,964	0,06837	AURKB	-3,170	9,997	0,41729	AURKB	-15,067	0,697	0,06111	
FOXM1	42,142	36,532	59,386	45,955	1,532	1,973	0,961	0,642	FOXM1	17,244	2,277	0,00004	FOXM1	-5,610	1,329	0,00885	FOXM1	-13,431	1,001	0,00002	same
CASP9	25,898	24,054	44,129	29,296	6,577	5,889	#DIV/0!	#DIV/0!	CASP9	13,978	#DIV/0!	#DIV/0!	CASP9	-1,844	6,063	0,36791	CASP9	-14,833	#DIV/0!	#DIV/0!	
MCL1	79,351	63,440	92,105	78,628	1,264	1,284	0,618	0,363	MCL1	12,754	1,785	0,00005	MCL1	-15,911	1,162	0,00005	MCL1	-13,477	0,369	0,00000	same
F3	69,347	78,825	81,526	84,787	4,824	5,147	4,312	1,647	F3	12,179	8,295	0,01554	F3	9,478	5,265	0,04025	F3	3,261	5,953	0,14412	anti
LGALS9	40,042	86,067	42,268	79,885	1,240	19,705	#DIV/0!	#DIV/0!	LGALS9	11,164	13,881	0,16991	LGALS9	46,025	18,465	0,04049	LGALS9	37,618	#DIV/0!	#DIV/0!	
POGZ	37,747	45,011	49,491	54,808	0,147	0,724	1,306	0,910	POGZ	11,031	0,455	0,00079	POGZ	7,264	0,577	0,00256	POGZ	5,317	0,697	0,00222	same
CHEK1	75,816	89,218	84,444	93,339	1,674	2,172	1,765	0,508	CHEK1	8,628	2,818	0,00178	CHEK1	13,403	3,501	0,00053	CHEK1	8,895	1,696	0,00055	
AURKA	7,160	11,991	14,796	21,998	3,356	3,786	0,263	3,942	AURKA	7,636	3,566	0,00856	AURKA	4,831	5,875	0,08675	AURKA	7,202	4,068	0,01713	
GTF2H2	9,848	9,166	16,101	14,383	0,373	0,358	1,146	1,647	GTF2H2	6,254	1,146	0,00042	GTF2H2	-0,681	0,218	0,04230	GTF2H2	-1,719	2,027	0,10601	
FANCA	58,004	62,350	63,594	66,094	1,062	0,881	3,914	2,289	FANCA	5,590	3,023	0,03771	FANCA	4,345	1,940	0,00275	FANCA	2,500	5,444	0,19681	
FASTK	82,896	66,095	87,314	63,582	7,113	2,407	1,629	6,830	FASTK	4,417	8,739	0,17680	FASTK	-16,801	8,916	0,00896	FASTK	-23,731	6,869	0,00212	
BCL2L11	42,471	53,834	44,100	58,522	1,636	5,958	1,208	3,023	BCL2L11	1,629	1,555	0,11878	BCL2L11	11,363	7,318	0,01668	BCL2L11	14,422	4,229	0,00077	
PPP3CB	81,948	82,689	83,007	88,764	0,949	0,589	0,771	1,021	PPP3CB	1,059	0,278	0,10401	PPP3CB	0,741	1,482	0,15740	PPP3CB	5,757	1,765	0,00073	
NAP1L4	26,779	22,737	26,786	23,714	1,454	1,975	2,582	0,290	NAP1L4	0,007	1,610	0,49854	NAP1L4	-4,043	1,207	0,02309	NAP1L4	-3,072	2,567	0,05497	
CEP170	62,517	69,495	62,187	66,518	0,698	1,881	2,045	1,701	CEP170	-0,330	2,618	0,40224	CEP170	6,978	1,545	0,00191	CEP170	4,331	2,504	0,02392	
CASC4	23,676	29,598	23,171	30,671	2,044	0,925	0,636	1,299	CASC4	-0,505	2,678	0,35196	CASC4	5,922	1,416	0,00512	CASC4	7,500	0,678	0,00042	
CDC25A	61,787	63,715	60,774	63,272	0,693	0,926	0,161	0,615	CDC25A	-0,716	0,662	0,11362	CDC25A	1,928	1,517	0,02235	CDC25A	2,498	0,777	0,01547	
SDCCAG8	83,368	87,892	81,114	84,869	1,862	3,318	4,431	1,766	SDCCAG8	-2,254	2,579	0,23105	SDCCAG8	4,524	4,016	0,05426	SDCCAG8	3,755	5,808	0,12219	
AXIN1	21,459	24,076	17,001	28,924	#DIV/0!	#DIV/0!	0,548	0,099	AXIN1	-2,790	1,600	0,03988	AXIN1	2,617	#DIV/0!	#DIV/0!	AXIN1	11,923	0,647	0,00054	
BRCA1	84,643	83,205	81,695	81,080	1,438	2,338	0,778	0,678	BRCA1	-2,948	0,797	0,01771	BRCA1	-1,438	1,286	0,20771	BRCA1	-0,615	0,124	0,18004	
ZWINT	81,455	78,438	78,257	77,967	1,464	1,956	1,228	1,015	ZWINT	-3,198	2,659	0,02210	ZWINT	-3,018	3,419	0,04958	ZWINT	-0,290	2,242	0,38422	
BNIP1	3,570	0,000	0,000	0,000	6,184	0,000	0,000	0,000	BNIP1	-3,570	6,184	0,18695	BNIP1	-3,570	6,184	0,18695	BNIP1	0,000	0,000	#DIV/0!	
CDC25B	78,529	78,905	74,638	80,194	1,156	0,969	2,555	1,987	CDC25B	-3,892	1,768	0,03702	CDC25B	0,375	2,108	0,34431	CDC25B	5,557	0,813	0,02050	
UTRN	92,038	92,966	87,577	87,237	1,074	0,631	1,201	3,181	UTRN	-4,461	1,544	0,00434	UTRN	0,929	1,688	0,13308	UTRN	-0,339	2,022	0,43560	
BCLAF1	54,510	50,640	48,519	43,117	2,425	0,914	1,417	1,098	BCLAF1	-5,991	2,480	0,01047	BCLAF1	-3,870	1,517	0,03046	BCLAF1	-5,402	1,116	0,00322	
TNFRSF10B	48,163	56,078	41,365	42,384	2,404	1,385	0,936	2,385	TNFRSF10B	-6,798	3,318	0,00515	TNFRSF10B	7,914	3,779	0,00391	TNFRSF10B	1,019	3,118	0,26446	
PCBP4	89,888	84,218	82,646	84,873	9,042	0,458	4,731	6,233	PCBP4	-7,242	5,252	0,14319	PCBP4	-5,670	8,748	0,16953	PCBP4	2,228	9,933	0,32390	
RBBP8	63,404	63,626	56,022	52,678	4,183	3,357	2,135	0,289	RBBP8	-7,381	2,049	0,02644	RBBP8	0,222	3,148	0,47312	RBBP8	-3,344	2,232	0,02737	
ESYT2	16,894	14,592	9,416	11,245	0,376	1,235	0,954	0,532	ESYT2	-7,479	0,783	0,00011	ESYT2	-2,302	1,599	0,01831	ESYT2	1,830	1,079	0,02202	
BRCA1	77,050	77,716	68,778	67,658	1,860	1,870	2,034	1,512	BRCA1	-8,272	3,884	0,00326	BRCA1	0,667	0,325	0,34205	BRCA1	-1,120	3,544	0,24334	
AKIP1	41,131	38,003	31,945	31,196	5,855	1,405	4,297	2,453	AKIP1	-9,185	9,175	0,04681	AKIP1	-3,128	5,879	0,20957	AKIP1	-0,749	2,060	0,40307	
RCC1	64,335	82,313	55,089	76,653	1,334	1,650	1,754	1,351	RCC1	-9,245	2,963	0,00095	RCC1	17,978	2,964	0,00006	RCC1	21,564	2,842	0,00004	
GPR137	82,608	80,450	73,289	77,762	3,461	2,652	5,916	3,751	GPR137	-9,319	3,857	0,03905	GPR137	-2,157	5,517	0,21993	GPR137	4,473	2,998	0,16538	
BCLAF1	91,213	89,841	81,365	82,122	0,741	2,120	2,017	3,046	BCLAF1	-9,848	1,494	0,00068	BCLAF1	-1,372	2,860	0,17488	BCLAF1	0,757	2,598	0,36891	
RP11	30,610	27,846	17,009	13,102	1,404	1,024	1,129	1,074	RP11	-13,602	0,561	0,00010	RP11	-2,764	1,041	0,02555	RP11	-3,906	1,267	0,00612	
CASP8	64,301	70,279	49,902	57,417	2,161	1,531	2,597	3,201	CASP8	-14,091	#DIV/0!	#DIV/0!	CASP8	5,978	3,692	0,04286	CASP8	7,515	0,605	0,06161	
TSSC4	79,365	78,241	62,996	65,929	7,823	3,346	2,693	2,214	TSSC4	-16,370	9,626	0,01330	TSSC4	-1,124	9,744	0,41508	TSSC4	2,933	3,803	0,10939	
SPTAN1	39,097	53,250	22,323	39,813	0,002	1,135	1,154	3,902	SPTAN1	-16,774	1,156	0,00001	SPTAN1	14,153	1,136	0,00001	SPTAN1	17,490	3,128	0,00087	same
KIF13A	36,958	39,435	20,041	21,997	1,464	3,096	2,998	4,471	KIF13A	-16,917	1,543	0,00046	KIF13A	2,478	3,912	0,13921	KIF13A	1,956	2,849	0,28163	
MAPK10	70,246	68,509	46,657	67,723	6,565	3,564	6,616	4,306	MAPK10	-23,589	7,170	0,00592	MAPK10	-1,738	9,284	0,35380	MAPK10	21,066	5,420	0,00493	co-opt
INCENP	55,347	36,581	23,014	20,070	1,090	2,003	0,723	1,502	INCENP	-31,567	0,905	0,00000	INCENP	-18,767	0,913	0,00365	INCENP	-2,944	1,205	0,01885	anti
MAP2	53,786	72,290	21,140	38,085	2,946	2,959	0,521	7,226	MAP2	-32,556	1,476	0,00001	MAP2	18,504	0,013	0,01226	MAP2	16,945	7,747	0,04026	same
DOM3Z	71,019	52,746	23,884	20,772	6,505	5,080	3,307	4,300	DOM3Z	-47,135	5,866	0,00018	DOM3Z	-18,273	2,361	0,00927	DOM3Z	-3,112	7,158	0,18832	anti
BCL2L1	88,719	83,062	38,503	59,736	5,564	5,986	0,648	8,657	BCL2L1	-50,216	5,582	0,00005	BCL2L1	-5,856	11,520	0,14839	BCL2L1	21,233	8,290	0,00665	co-opt

Tableau supplémentaire 1 : Événements d'épissage sensibles à la staurosporine qui sont régulés par hnRNP A1/A2.

Les événements d'épissage sont classés par ordre de sensibilité à la staurosporine basé sur le ΔPSI moyen relativement aux contrôles non traités. Les événements d'épissage affichant un ΔPSI supérieur à 10 avec une valeur P plus petite que 0,05 sont indiqués par la couleur saumon. La réactivité à la déplétion d'hnRNP A1/A2 est ensuite indiquée (dans les conditions de croissances normales ou dans les cellules traitées à la staurosporine). Un ΔPSI supérieur à 5 avec une valeur P plus petite que 0,05 est considéré régulé par hnRNP A1/A2 et comparé entre les cellules traitées ou pas à la staurosporine. Les différences dans le changement observé sont indiquées dans la dernière colonne comme same, co-opt, anti ou reconfig. Les déviations standards et les valeurs P pour les différences sont indiquées. Tous les essais ont été effectués en triplicatas.

PSI-AVERAGE									St.dev				cut-off ΔPSI: >10I, P value <0.05				cut-off ΔPSI: >5I, P value <0.05				cut-off ΔPSI: >5I, P value <0.05			
Gene	CTRL	siSam68	STAURO	STAURO-siSam68	CTRL	siSam68	STAURO	STAURO-siSam68	Gene	ΔPSI(STAURO-CTRL)	St.dev	P values	Gene	ΔPSI(siSam68-CTRL)	St.dev	P values	Gene	-ΔPSI(STAURO-CTRL-siSam68)	St.dev	P values				
KITLG	24,014	31,294	65,243	59,396	0,929	1,486	0,784	3,067	KITLG	41,229	1,236	0,000	KITLG	7,280	0,825	0,001	KITLG	-5,847	2,309	0,016	reconfig			
EXO1	17,132	17,678	52,823	45,385	0,958	1,525	0,866	0,733	EXO1	35,691	1,584	0,000	EXO1	0,547	2,482	0,313	EXO1	-7,437	0,407	0,000	co-opt			
POGZ	31,186	28,878	57,898	44,844	3,253	1,370	1,783	3,130	POGZ	26,712	4,282	0,000	POGZ	-2,308	2,420	0,160	POGZ	-13,054	4,269	0,002	co-opt			
FOXM1	40,999	26,567	67,425	40,215	0,652	1,234	2,387	2,855	FOXM1	26,427	2,943	0,000	FOXM1	-14,432	0,801	0,000	FOXM1	-27,211	2,402	0,000	same			
LGALS9	44,622	55,538	60,518	61,839	27,623	40,928	9,502	7,880	LGALS9	20,361	35,430	0,211	LGALS9	-11,315	47,239	0,342	LGALS9	1,321	4,946	0,431				
MCL1	77,466	73,088	93,689	87,840	0,073	0,594	1,244	2,316	MCL1	16,223	1,200	0,000	MCL1	-4,378	0,603	0,000	MCL1	-5,849	1,225	0,009	co-opt			
F3	69,338	65,017	83,478	79,015	8,555	5,600	0,248	1,845	F3	14,140	8,398	0,023	F3	-4,321	8,533	0,252	F3	-4,463	1,930	0,007	co-opt			
GTF2H2	8,079	7,591	19,729	13,733	0,391	0,930	1,812	1,182	GTF2H2	11,650	1,577	0,000	GTF2H2	-0,488	1,320	0,225	GTF2H2	-5,997	0,757	0,004	co-opt			
AURKA	6,640	5,536	17,756	11,205	3,777	0,807	3,446	1,847	AURKA	11,116	0,398	0,010	AURKA	-1,104	3,385	0,323	AURKA	-6,551	1,742	0,022	co-opt			
BCL2L11	39,097	36,762	49,940	44,903	2,252	5,346	1,437	1,448	BCL2L11	10,844	1,786	0,001	BCL2L11	-2,335	6,987	0,262	BCL2L11	-5,038	1,752	0,006	co-opt			
FASTK	75,403	74,806	81,696	75,134	2,395	0,235	11,880	0,068	FASTK	6,293	14,212	0,210	FASTK	-1,428	2,472	0,267	FASTK	-3,942	15,595	0,377				
PPP3CB	81,599	60,181	85,817	69,199	0,749	1,153	3,636	4,631	PPP3CB	4,218	4,300	0,060	PPP3CB	-21,418	1,875	0,000	PPP3CB	-16,618	7,558	0,004				
CEP170	56,504	66,836	59,418	61,079	2,186	2,154	0,723	2,112	CEP170	2,913	2,844	0,047	CEP170	10,331	2,548	0,002	CEP170	1,661	1,755	0,134				
CHEK1	79,399	78,521	80,741	80,866	2,552	1,926	1,948	0,130	CHEK1	1,342	4,239	0,255	CHEK1	-0,878	0,762	0,330	CHEK1	0,125	1,846	0,458				
BCLAF1	48,031	48,599	49,103	46,642	1,507	0,353	2,221	1,533	BCLAF1	1,072	1,717	0,264	BCLAF1	0,567	1,702	0,280	BCLAF1	-2,462	3,530	0,095				
FANCA	64,308	61,767	65,172	68,201	1,936	4,718	1,817	2,123	FANCA	0,864	2,517	0,302	FANCA	-2,541	6,632	0,218	FANCA	3,029	0,515	0,067				
CASC4	24,519	23,558	24,947	20,361	0,933	0,768	1,440	0,562	CASC4	0,427	0,507	0,344	CASC4	-0,961	1,615	0,120	CASC4	-4,586	1,714	0,003				
BNIP1	1,093	0,000	1,093	1,231	1,893	0,000	1,893	2,132	BNIP1	0,000	0,000	0,500	BNIP1	-1,093	1,893	0,187	BNIP1	0,138	3,488	0,469				
CDC25A	62,271	59,642	62,125	61,734	0,904	1,213	0,723	0,259	CDC25A	-0,146	1,187	0,419	CDC25A	-2,629	1,764	0,020	CDC25A	-20,970	35,332	0,266				
CDC25B	77,104	67,465	75,318	59,204	0,962	3,171	2,281	1,918	CDC25B	-1,786	1,341	0,140	CDC25B	-9,639	3,374	0,004	CDC25B	-16,114	2,317	0,000				
PCBP4	88,006	73,103	85,260	61,263	1,743	9,267	1,687	5,272	PCBP4	-2,746	0,529	0,061	PCBP4	-14,903	7,819	0,026	PCBP4	-23,997	4,233	0,001				
SDCCAG8	82,763	79,382	78,974	77,803	6,972	0,839	4,331	4,349	SDCCAG8	-3,790	11,054	0,234	SDCCAG8	-3,382	7,801	0,226	SDCCAG8	-1,171	5,924	0,379				
UTRN	91,291	91,464	86,258	82,876	1,581	0,502	1,240	1,470	UTRN	-4,847	3,275	0,049	UTRN	0,447	1,353	0,365	UTRN	-3,382	2,691	0,019				
BRCA1	87,164	84,767	82,026	82,597	0,832	1,319	0,678	1,189	BRCA1	-5,138	0,193	0,001	BRCA1	-2,397	1,075	0,028	BRCA1	0,571	1,739	0,255				
ZWINT	79,628	79,026	73,922	80,776	1,865	2,135	2,330	1,507	ZWINT	-5,706	3,872	0,015	ZWINT	-0,603	3,456	0,366	ZWINT	6,853	1,921	0,006				
NAP1L4	29,925	27,106	24,138	18,253	0,545	3,282	1,909	15,927	NAP1L4	-5,787	2,127	0,004	NAP1L4	-2,818	2,838	0,108	NAP1L4	-5,885	14,632	0,280				
TNFRSF10B	39,519	42,733	33,716	33,684	1,781	0,887	2,670	1,174	TNFRSF10B	-5,802	0,907	0,018	TNFRSF10B	3,215	2,665	0,024	TNFRSF10B	-0,032	2,689	0,493				
ESYT2	18,165	7,084	10,626	5,899	1,384	0,641	0,963	0,561	ESYT2	-7,539	1,199	0,001	ESYT2	-11,081	1,499	0,000	ESYT2	-4,727	0,871	0,001				
AURKB	61,268	61,687	53,700	66,924	5,932	#DIV/0!	3,749	9,407	AURKB	-7,568	6,484	0,068	AURKB	-2,686	#DIV/0!	#DIV/0!	AURKB	13,224	12,000	0,043				
AKIP1	42,796	49,510	34,593	39,964	1,372	3,695	2,762	3,896	AKIP1	-8,203	1,703	0,005	AKIP1	6,715	2,924	0,021	AKIP1	5,371	1,452	0,062				
RCC1	69,105	69,407	58,970	62,982	1,687	1,500	2,616	3,026	RCC1	-10,059	5,382	0,036	RCC1	-0,563	1,577	0,342	RCC1	4,012	1,555	0,079				
GPR137	82,295	78,633	69,582	69,601	7,451	6,932	1,709	7,826	GPR137	-11,730	7,252	0,078	GPR137	-6,650	13,971	0,221	GPR137	0,019	9,404	0,498				
BRCA1	80,787	81,833	66,416	75,742	3,330	2,496	2,576	2,642	BRCA1	-14,371	5,421	0,002	BRCA1	1,046	4,643	0,343	BRCA1	9,325	4,848	0,006	co-opt			
BCLAF1	89,924	90,124	74,960	84,931	1,636	2,775	3,828	1,662	BCLAF1	-14,964	3,497	0,002	BCLAF1	0,199	3,833	0,460	BCLAF1	9,971	2,174	0,007	co-opt			
RBBP8	63,007	54,510	47,027	45,744	1,446	1,204	0,940	2,361	RBBP8	-15,980	1,815	0,000	RBBP8	-8,497	1,042	0,001	RBBP8	-1,283	3,300	0,216	anti			
RP11	31,621	25,013	14,739	14,859	3,440	1,203	1,407	0,352	RP11	-16,882	4,576	0,001	RP11	-6,608	3,206	0,017	RP11	0,120	1,532	0,446	anti			
SPTAN1	36,006	26,241	17,829	18,517	0,431	1,659	1,292	1,188	SPTAN1	-18,177	1,195	0,000	SPTAN1	-9,765	2,087	0,000	SPTAN1	0,689	1,332	0,267	anti			
MAPK10	73,648	73,553	52,869	73,147	11,903	15,332	13,229	8,472	MAPK10	-20,779	24,911	0,057	MAPK10	-0,096	27,185	0,497	MAPK10	20,278	13,544	0,045				
KIF13A	45,458	27,584	16,684	18,613	4,837	2,829	4,128	1,848	KIF13A	-28,774	8,832	0,001	KIF13A	-17,874	2,014	0,003	KIF13A	1,929	5,899	0,251	anti			
INCENP	62,232	25,957	22,438	14,434	1,062	0,307	2,830	1,598	INCENP	-39,795	2,302	0,000	INCENP	-36,275	1,300	0,000	INCENP	-6,940	1,439	0,052	anti			
MAP2	59,500	37,482	15,271	14,719	0,436	2,862	4,364	2,180	MAP2	-41,710	0,309	0,000	MAP2	-20,635	1,780	0,003	MAP2	-0,552	4,795	0,427	anti			
BCL2L1	80,840	74,719	33,899	56,416	5,463	1,717	5,241	8,484	BCL2L1	-46,941	7,158	0,000	BCL2L1	-6,121	6,064	0,069	BCL2L1	22,516	12,743	0,009	co-opt			
DOM3Z	71,169	69,151	20,693	39,180	0,623	2,512	0,383	4,837	DOM3Z	-50,476	0,246	0,000	DOM3Z	-2,018	2,520	0,124	DOM3Z	18,488	5,218	0,001	co-opt			

Tableau supplémentaire 2 : Événements d'épissage sensibles à la staurosporine qui sont régulés par Sam68.

Les événements d'épissage sont classés par ordre de sensibilité à la staurosporine basé sur le Δ PSI moyen relativement aux contrôles non traités. Les événements d'épissage affichant un Δ PSI supérieur à 10 avec une valeur P plus petite que 0,05 sont indiqués par la couleur saumon. La réactivité à la déplétion de Sam68 est ensuite indiquée (dans les conditions de croissances normales ou dans les cellules traitées à la staurosporine). Un Δ PSI supérieur à 5 avec une valeur P plus petite que 0,05 est considéré régulé par Sam68 et comparé entre les cellules traitées ou pas à la staurosporine. Les différences dans le changement observé sont indiquées dans la dernière colonne comme same, co-opt, anti ou reconfig. Les déviations standards et les valeurs P pour les différences sont indiquées. Tous les essais ont été effectués en triplicatas.

CHAPITRE III- ALTÉRATIONS MAINTENUES DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF PAR LA DÉPLÉTION TRANSITOIRE DE RNPS1

Avant-propos: Ce projet fut initié dans notre laboratoire par un étudiant postdoctoral, M. Jérôme Barbier (Ph.D.). M. Barbier a créé, avec l'aide de notre technicienne Johanne Toutant, la lignée cellulaire HCT116 shRNPS1 utilisée dans cette section de la thèse. Après la création de la lignée cellulaire, il a établi les paramètres expérimentaux nécessaires (durée de la déplétion transitoire de RNPS1, nombre optimal de vagues de déplétions, etc.) à la résolution de nos problématiques après plusieurs longs mois d'optimisation. Au niveau des résultats présentés dans ce chapitre de la thèse, Jérôme a effectué les premières expériences de vagues de déplétion avec un certain nombre de clones cellulaires (3 sur 4) et d'événements d'épissage alternatif classiques (96 des 192 unités d'épissage alternatif classiques pour lesquelles nous avons vérifié l'impact de la déplétion de RNPS1 sur l'altération permanente de leur profil d'épissage). Jérôme s'est ensuite concentré sur les unités contenant des VNTRs dont l'entièreté des résultats de celles-ci lui revient. J'ai par la suite repris ses expériences avec les unités classiques en étendant le nombre d'unités et de clones examinés avant de vérifier si les résultats obtenus avec RNPS1 pouvaient s'appliquer à d'autres protéines (TDP-43). Ainsi, dans ce chapitre de thèse, les résultats initiaux de Jérôme furent amalgamés aux miens et présentés dans les figures 1A, 1C, 4A, 4C, 5A et 5C. Par son travail acharné et intellectuel, Jérôme a posé les bases de ce projet dont j'ai repris le flambeau. Une partie des résultats présentés dans cette section de la thèse viennent donc directement de ses travaux. Jérôme a aussi créé plusieurs lignées cellulaires et testé de nombreuses possibilités d'induction d'instabilité génomique dont les résultats ne figurent pas dans cette thèse.

CHAPITRE III- INTRODUCTION

La régulation d'un événement d'épissage alternatif repose sur une combinaison très complexe de nombreux facteurs dont l'un des plus importants est la présence et l'implication de séquences ou régions régulatrices qui, au travers de la liaison à celles-ci de

protéines régulatrices issues des familles élargies des protéines SR ou hnRNP, vont réguler la reconnaissance des sites d'épissage par la machinerie du spliceosome. L'exemple du gène Bcl-x présenté dans les premiers chapitres de cette thèse illustre bien, de par la présence de nombreuses régions régulatrices et facteurs associés impliqués dans la sélection entre les deux sites d'épissage alternatif 5', la complexité de la régulation d'un événement d'épissage alternatif. L'intégralité nucléotidique des séquences régulatrices étant primordiale pour leur action, une mutation engendrée par une instabilité génomique qui survient dans des regroupements de séquences régulatrices pourrait donc avoir un impact important sur la régulation d'un événement d'épissage alternatif. L'impact de l'instabilité génomique sur les profils et la régulation de l'épissage alternatif demeure un aspect sous-étudié de la recherche sur l'épissage. Mon projet vise à aborder l'étude de ce sujet. Les résultats qui découleront de ces travaux permettront éventuellement de tisser des liens entre les mécanismes d'adaptation cellulaire et d'évolution des variants d'épissage face aux stress afin de conférer à la cellule de nouvelles propriétés.

CHAPITRE III- MATÉRIEL ET MÉTHODES

Création des lignées cellulaires

Le système permettant la déplétion de RNPS1, de TDP-43 et la surexpression de la RNase H1 3X FLAG est constitué des plasmides pTer+, pcDNA4 t0/neo et pCDNA6/TR. L'expression des plasmides pTer + (promoteur H1) dans lequel sont insérés les shRNAs et pcDNA4 t0/neo dans lequel est inséré l'ADNc de la RNase H1 taggée est sous le contrôle du répresseur Tet encodé sur le plasmide pcDNA 6/tr. L'ajout de doxycycline permet l'expression des shRNAs et de la RNase H1 suite à la levée de la répression exercée par le plasmide pCDNA 6/TR. De ce fait, aucune tétracycline en doit être présente dans le milieu de culture utilisé pour les lignées HCT116 afin d'éviter l'activation non désirée du système pTER/6TER. Pour la transfection, 600 000 cellules HCT116 ont étéensemencées dans des puits 35 mm². Après 24 heures, 2 µg d'ADN plasmidique et 5 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ont été incubés pendant 20 minutes dans 100 µL d'Opti-MEM (volume final) avant d'être ajoutés aux puits qui contiennent 1 mL de McCoy's. Six heures plus tard, le milieu McCoy's est enlevé et remplacé par 1 mL de McCoy complet (10% FBS). 24 heures

post-transfections, la sélection est effectuée. Pour la création des lignées shTDP-43 et shRNPS1, 18ug/mL de blasticidine (Wisent), et 400 ug/mL de zéocine (Invitrogen) sont ajoutés au milieu de culture. Pour la création de la lignée surexprimant RNase H1 3X FLAG, 3mg/mL de G418 (Wisent), 9ug/mL de blasticidine (Wisent), et 200 ug/mL de zéocine (Invitrogen) sont ajoutés au milieu de culture. La lignée surexprimant la RNase H1 est créée à partir d'un sous-clone de la lignée HCT116 shRNPS1. G418 permet la sélection du plasmide surexprimant la RNase H1 (pcDNA4 t0/neo) alors que la zéocine et la blasticidine le font pour les plasmides pCDNA6/TR et pTer+ respectivement. Les amas individualisés de cellules survivantes sont récupérés et remis en culture séparément pour créer nos sous-clones expérimentaux. Après sélection, la présence de drogues dans le milieu de culture est maintenue pour la conservation des plasmides, mais leur concentration est abaissée à 9ug/mL de blasticidine et 200 ug/mL de zéocine (et 1,5 mg/mL de G418 pour la lignée surexprimant la RNase H1).

Création de minigènes

Les produits de PCR utilisés pour la création des minigènes ADARB1, PPIL2, ABCD4 et IL28RA ont été synthétisés à partir de l'ADN génomique des cellules t0 et t42. Les conditions de réaction sont les suivantes : 5µL d'ADNg (2,5 ng/µL), 12,5 µL de GoTaq Mix (Promega, contient une polymérase de haute fidélité), 0,5 µL d'amorce forward (10 µM), 0,5 µL d'amorce reverse (10 µM) et 6,25 µL d'eau. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 3 minutes à 95°C suivi de 35 cycles à 95°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute, pour finir avec une phase d'extension/amplification de 10 minutes à 72°C. Les produits d'amplification ont été insérés dans le plasmide pcDNA3.1+. Pour se faire, les plasmides et les produits d'amplification de PCR ont été digérés par des endonucléases de restriction, puis purifiés sur gel d'agarose et ensuite déphosphorylés avec 5U de phosphatase Antartic (NEB) et de tampon ANT IX (NEB). La ligation a été effectuée avec 40U de ligase T4 DNA ligase, tampon OPA IX, 1,0 µL de PEG et 12,5mM de rATP pour un volume final de 10 µL. La ligation a été effectuée à 4°C O/N.

Pour la création du plasmide pcDNA4 t0/neo contenant la RNase H1 3X FLAG, l'ADNc de la RNase H1 fut d'abord amplifié par transcription inverse à partir de l'ARNm extrait

de cellules. Les produits de PCR furent par la suite synthétisés à partir de cet ADNc et dans les mêmes conditions que les minigènes précédents. La RNase H1 fut d'abord insérée (HindIII/BamHI) dans le plasmide p3XFLAG-CMV afin d'acquérir une étiquette 3X FLAG en C-terminal. Par la suite, le locus de la RNase H1 fut amplifié à nouveau par PCR en utilisant une nouvelle amorce reverse (EcoRI) permettant de conserver la nouvelle étiquette, et inséré dans le plasmide pcDNA4 t0/neo (HindIII/EcoRI) afin de se trouver sous le contrôle d'un promoteur inductible. Tous les minigènes ont été séquencés avant leur transfection dans les lignées HCT116.

Pour les minigènes pTER+ shRNPS1 et shTDP-43, les paires d'oligonucléotides correspondantes ont été hybridées et insérées dans le plasmide pTer + BglII/HindIII.

Séquences des oligonucléotides shARNs :

shRNPS1Fwd

5'-GATCCCCAAAGGAAGACCAGTAGGAAATTCAAGAGATTTCTACTGGTCTTC
CTTTGTTTTTTGGAAAA-3'

shRNPS1Rev

5'-AGCTTTTCCAAAAACAAAGGAAGACCAGTAGGAAATCTCTTGAATTTCTTA
CTGGTCTTCCTTTGGG-3'

shTDP-43Bfwd

5'-GATCCCCTACAATTGATATCAAATTCAAGAGATTTGATATCAATTGTAGTG
TTTTTGGAAA-3'

shTDP-43Brev

5'-AGCTTTTCCAAAAACACTACAATTGATATCAAATCTCTTGAATTTGATATCA
ATTGTAGTGGG-3'

Culture cellulaire et transfection

Les cellules HCT116 (ATCC) ont été cultivées à 37°C (5% CO₂) dans du milieu McCoy (Wisent) complété avec 10 % de FBS. Les cellules HIEC (ATCC) ont été cultivées à 37°C (5% CO₂) dans du milieu Opti-MEM (Wisent) complété avec 5 % de FBS et 10 nM GlutaMAX (Qibco). La doxycycline a été obtenue de BD BioSciences.

Pour les transfections de plasmides, 300 000 cellules HCT116 ont étéensemencés dans des puits 35 mm². Après 24 heures, 1 µg d'ADN plasmidique et 5 µL de polyéthylèneimine (1 µg/µL) (Polysciences) ont été incubés pendant 20 minutes dans 100 µL d'Opti-MEM (volume final) avant d'être ajoutés aux puits qui contiennent 1 mL de McCoy's. Six heures plus tard, le milieu McCoy's est enlevé et remplacé par 1 mL de McCoy complet (10% FBS). Les cellules sont récoltées 18 heures après à l'aide d'un grattoir (policeman) et centrifugées à 2000 rpm. Les cellules seront lavées avec du PBS (tampon phosphate salin), recentrifugées et resuspendues dans 1mL de TRIzol (Invitrogen) pour congélation à -80°C.

Pour les expériences échelonnées sur 42 jours, soit les vagues de déplétions, les passages cellulaires et l'expérience de surexpression de la RNase H1 3X FLAG simultanément avec celle du shRNPS1, les cellules sontensemencées dans des puits 35 mm². À l'atteinte de la confluence, les cellules sont divisées en 5 puits dans le but de pouvoir extraire l'ADN, l'ARN et les protéines de ces cellules et de congeler certaines pour les futures expériences de transfections croisées. Après 24 heures, les cellules des puits destinés à la congélation ou à l'extraction de l'ADN, de l'ARN et des protéines sont récoltées à l'aide d'un grattoir (policeman) et celles du puit restant sont induites (ou pas dans le cas de l'expérience des passages cellulaires uniquement) à la doxycycline 1,5ug/mL. Le début de l'induction sera notre point de départ de l'expérience (T0). 24 heures avant la fin des 7 jours d'induction, les cellules sont à nouveau divisées en 5 puits pour les mêmes raisons citées plus haut. Après 7 jours d'induction, la doxycycline est retirée du milieu pour une période équivalente de 7 jours dans le cas de shRNPS1 ou de 9 jours dans le cas de shTDP-43. Cette ronde de déplétion est répétée à nouveau deux autres fois pour un total 42 jours pour shRNPS1 et 48 jours pour shTDP-43

Dans l'expérience de vérification de l'impact de la doxycycline, nous avons utilisé une lignée HCT116 contenant un pTER+ vide, donc sans shRNA. La lignée fut traitée ou pas en parallèle avec 1,5ug/mL de doxycycline pendant 7 jours. Les cellules sont par la suite récoltées à l'aide d'un grattoir (policeman).

Dans l'expérience de vérification de l'impact de l'inactivation du NMD, 300 000 cellules HCT116 ont étéensemencés dans des puits 35 mm². Après 48 heures, 3 µM d'émétine

(Sigma-Aldrich) est ajouté au milieu de culture. Après une période de 3 heures, les cellules sont récoltées à l'aide d'un grattoir (policeman).

Pour le calcul du <<population doubling>> dans l'expérience avec les HIEC, nous avons utilisé la formule suivante : $PD = \text{Log} (Nf/No)/\text{Log}2$ où No est la quantité de cellules initialement ensemencées dans le puit et Nf est la quantité de cellules présence dans le puit au moment de la mesure et calculée à l'aide d'un hémacymètre.

Extraction d'ARN

Les cellules congelées dans le TRIzol furent dégelées et 200 μL de chloroforme fut ajouté aux tubes. Après resuspension des cellules par quelques coups de vortex, les tubes furent centrifugés pendant 15 minutes à 4°C à une vitesse de 13 000 rpm. La phase aqueuse fut récupérée à laquelle on a ajouté 1 μL de glycogène et 320 μL d'isopropanol avant de vortexer le tout et de centrifuger à nouveau les tubes pendant 10 minutes à 4°C à une vitesse de 13 000 rpm. Après avoir éliminé le surnageant, les culots d'ARN furent lavés 2 fois avec 900 μL d'éthanol 70% froid (centrifugation pendant 5 minutes à 4°C à une vitesse de 13 000 rpm), séchés puis resuspendus dans 20 μL d'eau Nanopure (Qiagen). Les extraits d'ARN totaux sont traités par la suite avec 1U de DNaseI (1U / μL , Fermentas) pendant 30 minutes à 37°C. La DNase est inactivée par l'ajout de 1 μL d'EDTA 25mM et une incubation à 65°C pendant 10 minutes.

Analyse de RT-PCR

Le profil d'épissage de Bcl-x, SLIT2, TCERG1, Clk/Sty et des minigènes a été déterminé par RT-PCR. La transcription inverse (RT) a été effectuée en utilisant l'OmniScript RT kit (Qiagen) avec des hexamères aléatoires pour les ARNm endogènes de Bcl-x, SLIT2, TCERG1, Clk/Sty et l'amorce RT3 (5'-GAAGGCACAGTCGAGGCTG-3') pour les ARNm issus des minigènes. La réaction fut effectuée à 37°C, pendant 1 heure, dans les conditions suivantes : 2 μL d'ARN, 1,42 μL d'eau, 0,5 μL de tampon Omniscript 10X (Qiagen), 0,5 μL de dNTPs (0,5mM), 0,08 μL de RNase Out (Roche), 0,25 μL d'amorce (10 μM) et 0,25 μL de transcriptase inverse Omniscript (Qiagen) pour un volume total de 5 μL .

Séquences des amorces de PCR :

Bcl-x:

X3: 5'-ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG-3'

X2: 5'TCATTTCCGACTGAAGAGTGA-3'

SLIT2:

SLIT2.F36: 5'-GGCAAGTTTCAACCATATGCC-3'

SLIT2.R4: 5'-GGAGCCATAAATGACTGGTGAC-3'

TCERG1:

CA150 E20S: 5'-AAGTTCTCCTCCAGTGACAGG-3'

CA150 E23S: 5'-GGTGCTGATCCGATTCTTGG-3'

Clk/Sty:

Clk/Sty E3S: 5'-CGGTATCAGAACCATAGTAGC-3'

Clk/Sty E6AS: 5'-TACTGCTACATGTCTACCTCC-3'

Minigènes:

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

RT4: 5'-CTGATCAGCGGGTTTAAACG-3'

Pour le PCR conventionnel, 1 µL d'ADNc est incubé avec 2,5 µL de tampon Taq 10X (NEB), 0,3 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL de chaque amorce (50 µM), 0,2 µL de TAQ polymérase (1U) (NEB) dans un volume total de 25 µL. Pour le PCR radioactif (chaud), 0,1 µL d' α -32P dCTP (PerkinElmer Canada Inc.) a été ajouté au mix de PCR. Un premier cycle de 3 minutes à 95°C a été suivi de 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C. La réaction de PCR s'est terminée avec une étape d'extension de 10 minutes à 72°C. Les produits d'amplification ont été séparés dans un gel natif de 4% de polyacrylamide (29:1, acrylamide, Bis-acrylamide) pour être visualisés par autoradiographie via un STORM PhosphorImager 860 (GE Healthcare). L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le programme Image-Quant.

Pour l'étude à grande échelle des profils d'épissage des 192 ASEs classiques, des 116 ASEs liées et/ou régulées par TDP-43 et des 43 unités comprenant des VNTRs, les RT-PCRs ont été effectués par la plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke. La liste des amorces employées est présente en annexe (Tableau supplémentaire 1). La

transcription inverse a été faite en utilisant 10 unités de transcriptase inverse Transcriptor, 20 unités de RNaseOUT (Invitrogen), 3,2 µg d'hexamères aléatoires, 1 µM de mix dNTPs, 1X de tampon de réaction Transcriptor RT et 0,2 à 2 µg d'ARN total. Le PCR fut effectué en utilisant 0,2 unités de polymérase Platinum Taq, 0,6 µM d'amorces, 1,5 mM de MgCl₂, 10 ng d'ADN complémentaire, 1X de tampon de réaction PCR et 200 µM de mix dNTPs. Les réactions de PCR sont performées dans des thermocycleurs GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Scientific-Invitrogen). Un premier cycle de 15 minutes à 95°C a été suivi de 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C. La réaction de PCR s'est terminée avec une étape d'extension de 10 minutes à 72°C. La visualisation et l'analyse des produits d'amplification ont été effectuées par électrophorèse capillaire avec la micropuce on Labchip GX Touch HT instruments (Perkin Elmer).

Immunobuvardage de type Western

Pour vérifier l'efficacité de la déplétion, les protéines totales ont été extraites des cellules et une analyse par immunobuvardage de type Western a été effectuée. Avant la migration des échantillons, ceux-ci sont bouillis pendant 3 minutes dans du Laemmli. Les protéines vont ensuite migrées dans un gel SDS-Page. Une fois la migration terminée, les protéines seront transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) dans du tampon de transfert (1,45% (poids/volume) glycine, 0,3% (poids/volume) Tris-base et 25% méthanol) pendant 1h30 à 100V à 4 °C. La membrane est ensuite rincée avec du TBST (0,24% (poids/volume) Tris-HCl, 0,8% (poids/volume) NaCl, 0,05% Tween 20 ajusté à pH 8,0) pendant 1 minute, puis bloquée avec du TBST 5% lait pendant 45 minutes, sous agitation, à température pièce. Après le blocage, la membrane est incubée sous agitation à 4°C avec la solution d'anticorps primaire préparée dans du TBST 1% lait à la concentration suggérée par le fournisseur. La membrane est ensuite lavée à trois reprises avec du TBST et la solution d'anticorps secondaire préparée dans du TBST 5% lait est ajouté à concentration désirée (1 :5000). Les anticorps secondaires étaient soit des polyclonaux anti-lapin (Cell Signalling 7074) ou anti-souris (BioCan 115-035-003). La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire à 4°C pendant 1 heure. Après trois lavages qui doivent totaliser un temps minimal de 20 minutes, la détection est réalisée avec les produits de chemiluminescence Western-Lighting-ECL (PerkinElmer) selon les instructions du fournisseur.

Provenance et dilution des anticorps primaires :

Anti-FLAG: souris, clone monoclonal M2 (Sigma-Aldrich), dilution 1:1000

Anti-TDP-43: lapin (provenance), dilution 1:1000

Anti- α -tubuline: lapin (Abcam), dilution 1:3500

Anti-H2AX (serine 139): souris, clone JBW301 monoclonal (Millipore), dilution 1:1000

Anti-PARP: lapin (Cell signalling), dilution 1:1000

Q-PCR

Cette manipulation a été effectuée par le LGFUS. La qualité de l'ARN et la présence de contamination par l'ADN génomique ont été vérifiées par Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). La transcription inverse a été effectuée sur 2 μ g d'ARN avec la transcriptase inverse Transcriptor, des hexamères aléatoires, dNTPs (Roche Diagnostics) et 10 U de RNaseOUT (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur pour un volume total de 20 μ L. Les amorces ont été resuspendues individuellement dans du Tris-EDTA (IDT) pour former des solutions mères de 20-100 μ M à partir desquelles on prépare des dilutions à 1 μ M d'amorces en paire dans de l'eau libre de RNase et DNase (IDT). Les réactions de qPCR ont été effectuées dans des plaques 96 puits dans un thermocycleur Realplex 2 (Eppendorf). Les conditions de réactions sont les suivantes : 5 μ L de 2X FastStart Universal SYBR Green Master mix (Roche Diagnostics), 10 ng (3 μ l) d'ADNc, et 200 nM (2 μ l) de solutions de paires d'amorces diluées, pour un volume total de 10 μ L. Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes : 10 minutes à 95°C suivi de 50 cycles de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C. Le niveau d'expression relative a été calculé en utilisant le logiciel qBASE. Le gène <<housekeeping>> utilisé fut PSMC4. Un contrôle sans template a été utilisé pour chaque paire d'amorces et il était toujours négatif.

Séquence des amorces employées:

PSMC4_global_for_1: 5'-GGCATGGACATCCAGAAG-3'

PSMC4_global_rev_1: 5'-CCACGACCCGGATGAAT-3'

RNPS1 for: 5'-AGGCTATGCGTACGTAGAGTTTG-3'

RNPS1 rev: 5'-GATCTCCTGGCCATCAATTT-3'

Transcription *in vitro*

Pour la production du transcrit nécessaire à l'essai de vérification de l'activité de la RNase H1 3X FLAG, nous avons tout d'abord synthétisé par PCR le template d'ADN à partir du minigène X2 et en utilisant les amorces T7-B3 (5'-ATTAAACCTCACTAAAGTATTATAAAAATGTCTCAGAG-3') et Region 20-18 Rev (5'-CCCTTCTGGGTGTTCTCTTCCAC-3'). Le produit d'amplification correspond à la région centrale répressive de SB1 (130 nt) qui avait été utilisée dans la chromatographie d'affinité du chapitre 1.

Pour la transcription chaude, les transcrits ont été produit dans les conditions suivantes : 50 pmol de produits d'amplification de PCR, 10 µL de Frank's buffer (400 mM de Tris-HCl pH 7,9; 0,1% Triton X-100, 200mM MgCl₂ et 20 mM spermidine), 1 µL de DTT 1M, 14 µL de rNTP (4 µL rATP, 4 µL rCTP, 4 µL rGTP, 2 µL UTP), 2 µL de RNAGuard (40U/µL, Invitrogen), 1 µL d' α -32P UTP (PerkinElmer Canada Inc.), 5 µL de pyrophosphatase (0,1U/µL) et 1,8 µL de T7 RNA polymérase (900U) et compléter le volume à 100 µL avec de l'eau Nanopure sans RNase. La réaction est incubée pendant 4 heures à 37°C. À la mi-réaction (2 heures), on a rajouté 1,8 µL de T7 RNA polymérase supplémentaire.

Après la réaction, 50 µL de formamide dye est ajouté au tube et l'échantillon est bouilli pendant 1min 30, puis placé sur la glace pour la même période de temps. Après migration dans un gel d'acrylamide (38 :2) dénaturant (8M Urée), la bande correspondant au transcrit est découpée. Le transcrit est récupéré du gel en utilisant 300 µL de tampon d'extraction (0,3 M d'acétate de sodium, 0,2% de SDS), puis purifié 2 fois avec 500 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1) pour être finalement précipité dans 1ml d'éthanol 100%. Le transcrit est resuspendu dans l'eau Nanopure sans RNase et conservés à -80°C.

Essai *in vitro* de vérification de l'activité de la RNase H1 3X FLAG

Pour la vérification de l'activité de la RNase H1 3X FLAG, nous avons produit des extraits nucléaires à partir de la lignée HCT116 surexprimant à la fois la RNase H1 3X FLAG et le

shRNA contre RNPS1. Cette lignée a été incubée au préalable avec ou sans doxycycline afin de produire des extraits induits et non induits.

Notre transcrit étant la région centrale répressive de SB1 (130 nt), nous allons créer le substrat (hybride ARN-ADN) de la RNase H1 en combinant celui-ci dans notre réaction avec un oligonucléotide d'ADN (Region 4 Rev : 5'-ACTCCAGCTGTATCCTTTCTCACGTGACACTG-3') qui lie la région centrale répressive en son milieu. Dans l'échantillon Scramble (Sc), l'oligonucléotide d'ADN a été échangé pour un qui ne devrait pas lier cette région de SB1 (SB1-CE1 Mut 32 reverse : 5'-AGTGGAGGGCGGCATCCAAACTG-3').

Nous avons utilisé 0,2; 0,4; 2 et 4 μ L d'extraits nucléaires induits et non induits (volume ajusté à 4 μ L avec du Tampon D). Les réactions ont été effectuées dans les conditions suivantes : 4 μ L d'extrait nucléaire, 0,5 μ L rATP (12,5 mM), 0,5 μ L $MgCl_2$ (80 mM), 0,5 μ L Créatine phosphate (0,5 M), 2,5 μ L PVA (13%), 0,25 μ L DTT (0,1 M), 0,25 μ L RNAGuard 40 (U/ μ L), 0,25 μ L KCl (1 M), 1,375 μ L Tampon D (20 mM Hepes pH 7,9 (KOH), 100 mM KCl, 20% glycérol, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT), 1 μ L de transcrit (30000 CPM) et 75 pmol d'oligonucléotide d'ADN. Dans les échantillons contrôles avec une RNase H1 commerciale, 0,25 μ L RNase H (5U/ μ L) a été ajouté. Les échantillons sont incubés à 30°C pendant 15 minutes. Ensuite, les produits de la réaction sont récupérés dans 500 μ L de tampon d'extraction (0,3 M d'acétate de sodium, 0,2% de SDS), puis purifiés avec 500 μ L de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1) pour être finalement précipités dans 1ml d'éthanol 100%. Les échantillons sont resuspendus dans 7 μ L de formamide dye, bouillis pendant 1min 30, puis chargés dans un gel d'acrylamide 7% (38 :2) dénaturant (8M Urée). Suite à la migration de 3 heures à 24 W, les produits de la réaction sont visualisés par autoradiographie via un STORM PhosphorImager 860 (GE Healthcare).

CHAPITRE III-Résultats

Les profils d'épissage changent au cours des générations dans les cellules en culture

La permanence des profils d'épissage au cours de la vie d'une cellule ou à l'échelle macroscopique des générations humaines demeure une question pour le moment sans réponse à laquelle personne ne s'est réellement attardée. Afin de répondre à cette question, il s'agira, dans un premier temps, de mesurer le taux d'altération d'unités d'épissage dans les cellules en culture en effectuant uniquement des passages cellulaires. L'instabilité intrinsèque des cellules cancéreuses sera peut-être suffisante pour promouvoir des changements dans ces profils. Nous utiliserons des cellules HCT116 (carcinome colorectal humain), choisies pour leur caractère quasi diploïde, ce qui devrait faciliter la détection subséquente de mutations.

Les cellules HCT116 sont mises en croissance pour environ 1 mois (42 jours exactement) en n'effectuant que pour seule intervention des passages cellulaires au moment requis. Au cours de cette période de temps, plusieurs divisions cellulaires se seront produites. L'ARN issu des cellules initiales (t0) et celles ayant subi 1 mois de passages cellulaires (t42) est récolté. À partir de ces échantillons, le niveau de production des différents variants pour chacun des événements d'épissage alternatif ou ASEs (*alternative splicing event*) sélectionnés sera déterminé par RT-PCR (*reverse transcription and polymerase chain reaction*) par la plateforme RNomique du LGFUS (Laboratoire de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke). Cette méthodologie sera également utilisée pour les expériences subséquentes.

Nous avons sélectionnés 192 ASEs de façon aléatoire à partir d'une banque du LGFUS, avec pour seul critère qu'il s'agisse d'exons alternatifs produisant deux variants. Suite à la quantification des variants, l'établissement du ratio d'épissage pour chaque unité permettra de comparer celui obtenu dans les cellules t42 vis-à-vis celui des cellules initiales t0. Le ratio d'épissage (PSI) est calculé à partir de la quantité d'isoforme longue vis-à-vis la quantité totale des isoformes produites pour un événement donné. Un ASE sera considéré comme altéré lorsque la différence entre les ratios est supérieure à 10 % (ce qui correspond

à un score Z score supérieur 1,5; représentant ainsi 1,5 déviation standard au-dessus ou en dessous de la moyenne) (Venables et al. 2008) ou lorsqu'une nouvelle isoforme est apparue ou disparue. Ainsi pour cette première série de 192 ASEs, quatre sous-clones cellulaires de la lignée cellulaire HCT116 ont été analysés. Le profil d'épissage de près du quart ($27,5\% \pm 3,4\%$) des ASEs s'est vu altéré au cours du temps (Fig. 1A). Ce résultat amène à revoir la notion même de la stabilité des événements d'épissage alternatif qui est souvent présumée comme étant peu ou pas variable au fil des divisions cellulaires. Les causes de ces variations sont inconnues, mais laissent présumer une possible contribution de l'instabilité génomique affectant les éléments de régulation (cis) ou des variations cycliques dans l'expression des régulateurs d'épissage (facteurs trans).

L'expérience fut reprise avec une nouvelle série de 116 ASEs (exons cassettes) ayant comme caractéristique commune d'être liées et/ou régulées par la protéine TDP-43 (Polymenidou et al. 2011; Sephton et al. 2011; Tollervy et al. 2011; Xiao et al. 2011; Colombrita et al. 2012; Arnold et al. 2013; Honda et al. 2013). L'exécution uniquement de passages cellulaires a entraîné pour cette série d'événements l'altération du profil d'épissage pour la moitié d'entre eux ($50,2\% \pm 6,0\%$) (Fig. 1B). Une dernière analyse a été conduite avec des ASEs incluant des VNTRs (*variable number tandem repeats*). Les VNTRs sont des motifs répétés d'une longueur de 6 à 100 nt et pouvant être étalés sur 0,5 à plusieurs kbp. Ce sont les régions les plus instables du génome. En raison de leur nature répétée, lors de chaque réplication/duplication cellulaire, les VNTRs sont souvent contractés ou étendus par atteinte à l'action ou glissement de la polymérase d'ADN. La présence de sites d'épissage ou d'éléments régulateurs au sein de ces motifs instables peut entraîner d'importantes conséquences sur la régulation et la diversification générée par l'épissage alternatif (Zhuo et al. 2007). À l'instar des événements liés par TDP-43, près de la moitié des ASEs comprenant des VNTRs voient leur profil d'épissage altéré avec le temps ($47,5\% \pm 15,8\%$) (Fig. 1C). Ainsi, les ASEs liés et/ou régulés par TDP-43 semblent aussi instables que les régions connues comme étant parmi les plus instables du génome.

L'instabilité génomique étant l'un des marqueurs du cancer, il se pourrait que l'instabilité intrinsèque des cellules cancéreuses soit responsable de la fréquence élevée des altérations de profil d'épissage avec le nombre de passages cellulaires. Nous avons donc répété

A	1	2	3	4	1	2	3	4
BTC	BTC	FOX.SYNE2	C11orf17	WDR1	GAB1	FAM33A	HNRNP93	
FOX.SYNE2	FOX.SYNE2	ARFIP1	BRD8 (2)	IKZF2	CLIC1	C10orf61	PPH2	
ARHGAP17	GABR2	C3orf17	HP51	HEM12	FBF1	UBE2D3	WBP5	
C3orf17	CENTG2	CENTG2	IL17	KIF9	CL13	WDR81	FLJ11515	
CENTG2	DKFZp76112123	HP51	LRP8	MEIS2	LRP8	PRKCBP1 (1)	MGC15875	
PTPNC1	NKTR	LRP8	NFATS (1)	MT	MT	ZNF421	SCMH1	
ECT2	CD151	NFATS (3)	NFATS (3)	C21orf66	PML	CES2	DMR1	
MBD1	PDE9A	DTNB	PALM	HNRNP93	HNRNPAB	PAB1	RASA4	
MRPL33	C21orf66	APRT	ARHGEF11	LRRC20	NFATC2	FBF1	RSRC2	
EHMT2	GTT2IRD1	ACOT9	FAM68A	SARPB2	RASA4	KIF9	FOX.SYNE2	
GABRP2	PRKCBP1 (3)	DHMT2	PCBP2 (1)	C14orf13	TMUB2	ATP2A1	AB1	
MGC15875	VKORC1	HNRNP93	APRT	RASA4	BCLAF1	TMEM22	ARFIP1	
PRKCBP1 (3)	ZFYVE27	MGC15875	C21orf66	RBM23	ERP29	CASC4	C3orf17	
FLJ11515	APTX	SNRPB2	DUSP6	STAT3	GTDC1	KTN1 (2)	DKFZp76112123	
RAP1GDS1	TMEM22	ATP2C1	ICHDC1	MCL1	VPS29	RASA4	GIT2	
UEVLD	POLB	DUSP6	TRAPP68	FOX.INSR	WARS	RSRC2	CDC25C	
CLIC1	ADARB1 (2)	RAP1GDS1	CASP8	ADARB1 (2)	PCBP2 (1)	ACLY	COL13A1	
GGA1	ANAPC11	UEVLD	PCBP2 (1)	ATP2A1	PALM	CASP8	GTT2IRD1	
GMEB1	AP2B1	FANCA	IKZF2	MKNK1	ERBB2IP	DIAPH1	MADO	
FAM33A	ARHGAP17	SEC23B	BTC	NFATS (1)	COL13A1	FOXPM	SNRPB2	
FBF1	NFATS (3)	BTC	HEM12	ASB1	DMR1	GGA1	VKORC1	
POLB	ATG16L1	ADARB1 (2)	PTPNC1	PML	ITGA6	GMEB1	C14orf159 (2)	
ANAPC11	ILG12	CDKSRAP2	BAZ1A	COL13A1	FOX.INSR	IL28RA	C16orf13	
CLIC1	MTMR2	GIT2	PALM	PHL2	INCEP	INCEP	C1orf63	
NFATS (3)	PAB1	PAB1	PAPPC8	TRP1	MAPKAP1 (5)	PCBP2 (1)	KTN1 (1)	
OSBP1	HNRNP93	BAZ1A	APAF1	C1orf43	APRT	PPARG	KTN1 (2)	
PALM	LRRC20	GABRP2	ATP2C1	DMR1	ALDH3B1	WAC	MRPL55	
PAOX	APG5L	MADO	RBMA7	ITGA6	MGC15875	C1orf17	RBMA7	
MTMR3	KIF9	PPP1CB	TMUB2	KTN1 (2)	PPH2	MEIS2	STAT3	
SMN2	GAT13	PRKCBP1 (3)	UEVLD	MRPL55	PPP1CB	C1orf63	ZFYVE27	
APRT	IL17	VKORC1	WAC	RSRC2	SCMH1	TRAPP68	CRK	
GTT2IRD1	C1orf17	APAF1	GTDC1	TMUB2	WBP5	POLB	PPARG	
PPP1CB	AB1	C14orf159 (2)	WAC	AB1	C1orf13	DKFZp76112123	ITGA6	
C14orf159 (2)	ARFIP1	ITGA6	APG5L	CDKSRAP2	C1orf43	ABCD4	ADARB1 (2)	
DUSP6	BRD8 (2)	KTN1 (1)	GAB1	LOWR13	DUSP6	LRRC23	ADNP	
ICHDC1	C3orf17	MRPL55	TMEM22	LRRC23	IRF7	ALDH3B1	ERBB2IP	
RUSC1	CDKSRAP2	RUSC1	APB1	ACOT9	LOWR13	CDC25C	LOWR13	
TMEM22	GIT2	ZFYVE27	ARHGAP17	CDK25C	LOC219854	COL13A1	ALDH3B1	
DCLRE1C	HEM12	DKFZP564102	ATP2A1	APAF1	DTNB	END3	DMT2	
IL28RA	HP51	HNRNP93	CENTG2	ACLY	EHMT2	LRRC20	TRP1	
NQO1	U066	APC	KIF9	BCLAF1	APAF1	PPH2	FRP29	
U066	MAPKAP1 (3)	IRF7	U066	FRP29	C14orf159 (2)	SCMH1	DKFZP564102	
LOC219854	MEIS2	MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	DKFZP564102	RSRC2	TRP1	MCL1	
BRD8 (2)	OSBP1	OATL1	OATL1	GTDC1	TRAPP68	C1orf43	LRD1	
APG5L	PTPNC1	IL17	OSBP1	IK	HNRNP93	DMR1	VPS29	
IRF7	ADNP	U066	DKFZP564102	POT1	PCBP2 (1)	IKZF2	GIT2	
APC	DKFZP564102	PTPNC1	ITGB4BP	PPARG	PPARG	RBMA7	CAMK1	
MAPKAP1 (3)	GIT2	ATP55	KCNAB2	RBMA7	SIABBP1	TMUB2	CLK1	
ARFIP1	ITGB4BP	APG5L	ASB1	C10orf61	FAM33A	ERP29	MEIS2	
AP2B1	KCNAB2	AB1	LOC219854	WARS	MKNK1	LRD1	MKNK1	
CAMK1	ECT2	AP2B1	MRPL33	ZNF621	APC	WARS	NKTR	
GIT2	ASB1	ARHGAP17	MT	END3	ATP2A1	ANAPC11	ICG2	
HP51	MBD1	BRD8 (2)	MTMR3	HSPPD2A	NFATS (1)	LOC219854	ATG16L1	
IL17	MRPL33	CAMK1	PML	OATL1	CDK25C	CLK1	ILG12	
DKFZP564102	MTMR3	HSPPD2A	SMN2	KCNAB2	MADO	GTT2IRD1	MTMR2	
GIT2	SMN2	HEM12	CD151	ATG16L1	FOX.INSR	TRP1	PAB1	
ITGB4BP	ARHGAP17	MKNK1	PDE9A	BRD8 (4)	IKZF2	NFATS (1)	CLIC6	
CD151	FAM68A	OSBP1	ABCD4	CLIC6	KTN1 (2)	NKTR	LRRC20	
MAPKAP1 (5)	PLOD2	PAOX	ATP55	MAK2	MRPL55	PAB1	PTPNC1	
PAB1	ABCD4	ADNP	DTNB	RBMA7	RBMA7	SMN2	RUSC1	
PDE9A	ATP55	DKFZP564102	LRRC23	PPP1CB	ZFYVE27	MTMR2	APTX	
ARHGAP17	LRRC23	GTT2	EPB41L1	APTX	DCLRE1C	HNRNPAB	GGA1	
FAM68A	EPB41L1	ITGB4BP	ADARB1 (4)	SIABBP1	DIAPH1	ILK	WARS	
GAB1	ADARB1 (4)	KCNAB2	AP3M1	VPS29	GGA1	VPS29	PRKCBP1 (1)	
ABCD4	AMACR	ECT2	BOLA3					
ADARB1 (4)	AP3M1	ASB1	BRD8 (4)					
AMACR	BOLA3	MBD1	ETH1A3					
AP3M1	BRD8 (4)	MRPL33	BTRC					
BOLA3	BTN1A3	MT	CASC4					
BTN1A3	BTRC	MTMR3	DCUN1D4					
BTRC	CASC4	ATG16L1	DPH8					
CASC4	CLIC6	CD151	GEMIN7					
CTBP1	CTBP1	ERBB2IP	GRB1					
DCUN1D4	DCUN1D4	ILG12	HNRNPAB					
DPH8	DPH8	LOWR13	C14orf173					
GRB1	GEMIN7	MAPKAP1 (5)	ODF21					
C14orf173	GRB1	PDE9A	OSBP1					
NDEL1	C14orf173	ARHGAP17	POG2					
NFATC2	NDEL1	FAM68A	END3					
POG2	GAB1	GAB1	GABRP2					
ALDH3B1	ODF21	PLOD2	PRKCBP1 (3)					
MADO	OSBP1	EPB41L1	RAP1GDS1					
SCMH1	POG2	ADARB1 (4)	ACLY					
WBP5	BAZ1A	AMACR	ATP2A1					
ATP2C1	ACOT9	AP3M1	BCLAF1					
KTN1 (1)	END3	BOLA3	C14orf159 (3)					
TRAPP68	GABRP2	BRD8 (4)	C17orf60					
ATP2A1	SNRPB2	BTN1A3	DCLRE1C					
C14orf159 (3)	ATP2C1	BTRC	DIAPH1					
CRK	ECHDC1	CLIC6	FANCA					
DIAPH1	FLJ11515	CTBP1	GMEB1					
FANCA	KTN1 (1)	DCUN1D4	GTPBP8					
FOXPM	RAP1GDS1	DPH8	HNRNP93					
GEM	RBMA7	GEMIN7	IL28RA					
GTPBP8	STAT3	GRB1	INCEP					
INCEP	UEVLD	C14orf173	NQO1					
NUP98	ACLY	MAK2	NUP98					
PCBP2 (1)	ATP2A1	NDEL1	PCBP2 (2)					
PCBP2 (2)	C14orf159 (3)	NFATC2	POT1					
LRD1	C17orf60	ODF21	SIABBP1					
LOC643446	CASP8	OSBP1	RBMA7					
RSU1	CRK	POG2	LOC643446					
SEC23B	DKFZP5641102	C21orf66	RSU1					
UBE2D3	FANCA	WBP5	SEC23B					
PRKCBP1 (1)	FOXPM	ECHDC1	C10orf63					
CES2	GEM	FLJ11515	UBE2D3					
C13orf17	GMEB1	RBMA7	WDR1					
PLOD2	GTPBP8	STAT3	ZNF621					
DKFZp76112123	IL28RA	APTX	CES2					
LRP8	ILK	ATP2A1	CTBP1					
NKTR	INCEP	BCLAF1	APC					
ADNP	MCL1	C14orf159 (3)	PAOX					
ERBB2IP	NQO1	C17orf60	IRF7					
ILG12	NUP98	CLIC1	CLIC1					
MTMR2	PCBP2 (2)	CRK	POLB					
ATP55	LRD1	DCLRE1C	ANAPC11					
DTNB	POT1	GEM	CDKSRAP2					
EPB41L1	RBMA7	GTDC1	FBF1					
GEMIN7	LOC643446	GTPBP8	HSPPD2A					
HNRNPAB	RSU1	MCL1	MBD1					
OSBP1	C10orf63	NQO1	MAPKAP1 (5)					
BAZ1A	UBE2D3	AMACR	AMACR					
VKORC1	WAC	POT1	MAK2					
C17orf60	WDR1	FOXPM	NDEL1					
CASP8	ZNF621	RBMA7	ILK					
HNRNP93	CES2	LOC643446	FAM33A					
WAC	PAOX	RSU1	FOX.INSR					

Taux d'altération de l'épissage alternatif
dans les HCT116 après 1 mois de
passages cellulaires :

Clone 1	62/192	
Clone 2	47/192	
Clone 3	37/192	27,5 % ± 3,4 %
Clone 4	65/192	

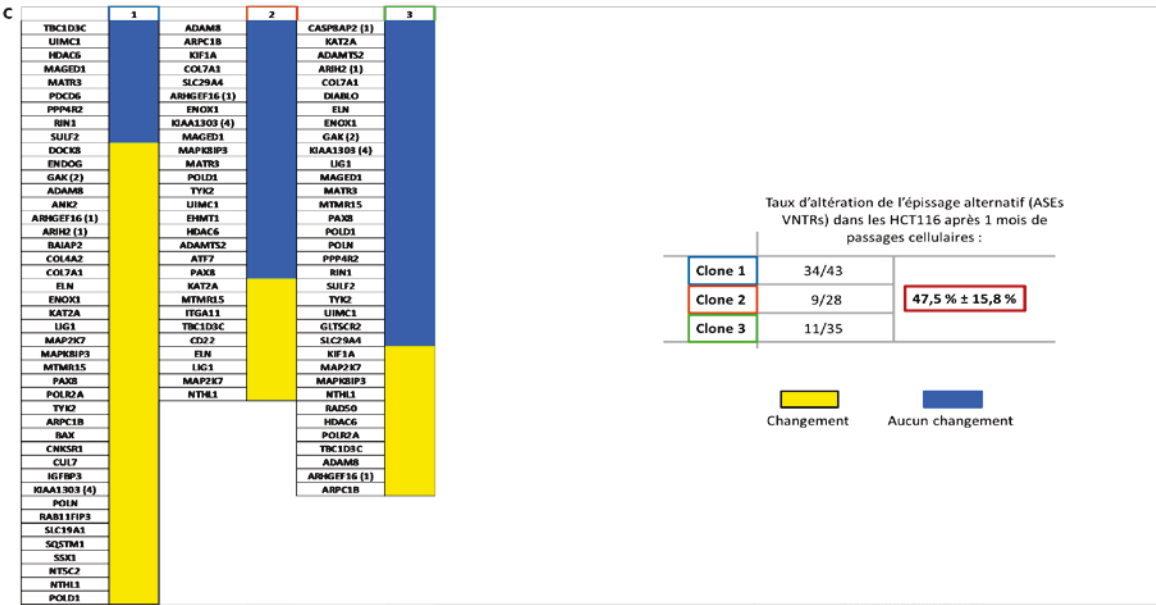
Changement Aucun changement

B	1	2	3	4
WBPS	GPBP1L1	CLIP1	DDR1	
ATP2C1	OGT	OGT	FAM114A2	
GPBP1L1	ZNF92	BCI2L11	GPBP1L1	
ZNF92	MEF2D	MEF2D	MEF2D	
FAM114A2	RGL1	RABGEF1	OGT	
RABGEF1	SUN1	RGL1	PUM1	
SUN1	RWDD1	RWDD1	TRAPPC9	
RWDD1	RAP1GAP2	UBITF	ATP11C	
UBITF	DDR1	PAJM	CDK5RAP2	
OPR1L	POPDC1	LNP1	DOS4F	
RGL1	UBITF	ATP2C1	IGSF3	
CASP9	PLCB1	ATP6V0B	LNP1	
PLCB1	OPR1L	BRD8 (2)	PLCB1	
ATG9A	NOTCH3	BTRC	POLDIP3	
KCND3	KCND3	CHKA	RWDD1	
LNP1	LNP1	CNTFR	WBPS	
PLI1B	ATP2C1	COL4A3BP	EIF4H	
ATP11C	ATP6V0B	CTTN	ANKRD12	
ATP6V0B	CNTFR	DDR1	ATP2C1	
BTRC	COL4A3BP	DOM47	RP524	
CLIP1	CTTN	DTNB	SENPG	
CNTFR	DDX47	GEMIN7	STAG2	
COL4A3BP	DTNB	GPBP1L1	UBITF	
DOS47	GEMIN7	GPBP8	ZNF92	
GEMIN7	HOMER2	HOMER2	GTF2IRD1	
GPBP8	HP1BP3	HP1BP3	SCRIB	
GTF2IRD1	IGSF3	IGSF3	CLIP1	
HOMER2	KJHL5	KCNQ3	MAPT	
HP1BP3	MAPK14	KIF1B	ASAP2	
IGSF3	MSL1	KJHL5	GTF3C2	
KJHL5	NAV2	MAPK14	SOD2	
MYADM	NRD1	NAV2	LSM14A	
NAV2	NSL1	NCOR1	NOTCH3	
NRD1	NUP35	NSL1	RGL1	
NSL1	RBM38	NUP35	CSNK2A1	
NUP35	SENPG	PDPK1	PALM	
OGT	SMARCA2	PLCB1	TCEAL8	
PUM1	SMAR2	RBM38	RAP1GAP2	
RBM38	STAG2	ST7	NR6A1	
SMARCA2	STARD4	STAG2	TPD52L2	
STAG2	SYF2	SYF2	CHKA	
SYF2	XKCC4	TCF20	CNTFR	
XKCC4	YTHDC1	TRAPPC9	COL4A3BP	
YTHDC1	GPBP8	WBPS	DTNB	
SNUPN	CASP9	ZNF92	GEMIN7	
EW5R1	SNUPN	XKCC4	GPBP8	
ST7	GTF3C2	CASP9	HOMER2	
GTF3C2	NCOR1	OPR1L	HP1BP3	
MSL1	HNRNPAB	SNUPN	KIF1B	
TCF20	ZRANB2	BRCA1	KJHL5	
ARMKC3	ARL13B	GTF2IRD1	MAPK14	
CSNK1A1	MOB4	MOB4	NAV2	
MP2L1	CHKA	MYADM	NSL1	
RP524	ASAP2	NRD1	NUP35	
TCEAL8	FOXO1	SMARCA2	RBM38	
PBR3	SRSF2	YTHDC1	SYF2	
KIF1B	TRAPPC9	CDK5RAP2	TCF20	
TIA1	AP251	MAPT	ZRANB2	
FOXO1	ARMKC3	MAPK14	BRCA1	
NCOR1	CSNK1A1	SENPG	MOB4	
SRSF2	KCNQ3	ASAP2	MYADM	
TRAPPC9	MAPK14	GTF3C2	NRD1	
KCNQ3	MP2L1	ATG9A	SMARCA2	
MAPK14	OSBP15	SOD2	XKCC4	
FAM160A2	ST7	DAG1	YTHDC1	
SCRIPN8	FAM160A2	FAM114A2	ACLY	
BCI2L11	RP524	LSM14A	AP251	
DAG1	SERPINB8	NOTCH3	ARMKC3	
LSM14A	SOD2	PI1RB	CASP9	
MEF2D	BCI2L11	SLC9A8	CREBBP	
PI1RB	DAG1	SNHG17	CSNK1A1	
SLC9A8	FAM114A2	SUN1	EW5R1	
SNHG17	LSM14A	ARRB1	FOXO1	
ARRB1	PI1RB	CSNK2A1	OPR1L	
CDK5RAP2	RABGEF1	AGBL5	SERPINB8	
CSNK2A1	SLC9A8	HDAC7A	SMN2	
AGBL5	SNHG17	MADD	SNUPN	
HDAC7A	ARRB1	MRPL24	MADD	
MADD	CDK5RAP2	POKIP3	BTRC	
MRPL24	CSNK2A1	RNF14	KCND3	
POLDIP3	AGBL5	SCRIB	MRPL24	
RNF14	HDAC7A	TCEAL8	ST7	
SCRIB	MADD	EIF4H	BCI2L11	
EIF4H	MRPL24	RAP1GAP2	CEPND	
RAP1GAP2	POLDIP3	NR6A1	DAG1	
NR6A1	RNF14	PEL1	HNRNPAB	
SGSM2	SCRIB	PBR3	MAST2	
TMEM55B	TCEAL8	SGSM2	PI1RB	
TPD52L2	EIF4H	TMEM55B	RABGEF1	
AP251	NR6A1	TPD52L2	SLC9A8	
ACLY	PEL1	KCND3	SNHG17	
BRCA1	PBR3	ATP11C	STARD4	
CHKA	SGSM2	NSL1	SUN1	
CTTN	TMEM55B	ZRANB2	ARRB1	
DTNB	TPD52L2	ACLY	ATP6V0B	
MAPK14	PALM	ANKRD12	BRD8 (2)	
MOB4	BTRC	AP251	CTTN	
SENPG	GTF2IRD1	ARL13B	AGBL5	
SMN2	MAST2	ARMKC3	HDAC7A	
BRD8 (2)	PUM1	CEPND	KCNQ3	
OSBP15	ACLY	CREBBP	MP2L1	
NOTCH3	ANKRD12	CSNK1A1	OSBP15	
PALM	ATG9A	EW5R1	ARL13B	
ANKRD12	ATP11C	FAM160A2	ATG9A	
ARL13B	BRCA1	HNRNPAB	FAM160A2	
ASAP2	BRD8 (2)	FOXO1	MAPK14	
CEPND	CLIP1	MAST2	PEL1	
CREBBP	CLIP1	MP2L1	PBR3	
DOR1	CREBBP	OSBP15	SGSM2	
HNRNPAB	EW5R1	PUM1	TIA1	
MAPT	KIF1B	RP524	TMEM55B	
MAST2	MAPT	SERPINB8	NCOR1	
PDPK1	MYADM	SMN2	PDPK1	
SOD2	TCF20	SRSF2	RNF14	
STARD4	TIA1	STARD4	MSL1	
ZRANB2	WBPS	TIA1	SRSF2	

Taux d'altération de l'épissage alternatif
(ASEs TDP-43) dans les HCT116 après 1
mois de passages cellulaires :

Clone 1	66/116	50,2 % ± 6,0 %
Clone 2	69/116	
Clone 3	60/116	
Clone 4	38/116	

Changement Aucun changement



D	HCT116				HIEC			
	1	2	3	4	1	2	3	
ABCD4	ABCD4	ABCD4	ABCD4	ABCD4	ABCD4	ABCD4	ABCD4	
ABR1	ABR1	ABR1	ABR1	ABR1	ABR1	ABR1	ABR1	
ADNP	ADNP	ADNP	ADNP	ADNP	ADNP	ADNP	ADNP	
CENTG2	CENTG2	CENTG2	CENTG2	CENTG2	CENTG2	CENTG2	CENTG2	
AMACR	AMACR	AMACR	AMACR	AMACR	AMACR	AMACR	AMACR	
AP2B1	AP2B1	AP2B1	AP2B1	AP2B1	AP2B1	AP2B1	AP2B1	
AP3M1	AP3M1	AP3M1	AP3M1	AP3M1	AP3M1	AP3M1	AP3M1	
ARHGAP17	ARHGAP17	ARHGAP17	ARHGAP17	ARHGAP17	ARHGAP17	ARHGAP17	ARHGAP17	
ASB3	ASB3	ASB3	ASB3	ASB3	ASB3	ASB3	ASB3	
APG5L	APG5L	APG5L	APG5L	APG5L	APG5L	APG5L	APG5L	
ATP5S	ATP5S	ATP5S	ATP5S	ATP5S	ATP5S	ATP5S	ATP5S	
BOLA3	BOLA3	BOLA3	BOLA3	BOLA3	BOLA3	BOLA3	BOLA3	
BRD8 (2)	BRD8 (2)	BRD8 (2)	BRD8 (2)	BRD8 (2)	BRD8 (2)	BRD8 (2)	BRD8 (2)	
BRD8 (4)	BRD8 (4)	BRD8 (4)	BRD8 (4)	BRD8 (4)	BRD8 (4)	BRD8 (4)	BRD8 (4)	
BTNA3	BTNA3	BTNA3	BTNA3	BTNA3	BTNA3	BTNA3	BTNA3	
BTRC	BTRC	BTRC	BTRC	BTRC	BTRC	BTRC	BTRC	
C3orf17	C3orf17	C3orf17	C3orf17	C3orf17	C3orf17	C3orf17	C3orf17	
CAMK2	CAMK2	CAMK2	CAMK2	CAMK2	CAMK2	CAMK2	CAMK2	
CASC4	CASC4	CASC4	CASC4	CASC4	CASC4	CASC4	CASC4	
CLCN6	CLCN6	CLCN6	CLCN6	CLCN6	CLCN6	CLCN6	CLCN6	
CTBP1	CTBP1	CTBP1	CTBP1	CTBP1	CTBP1	CTBP1	CTBP1	
DCUN1D4	DCUN1D4	DCUN1D4	DCUN1D4	DCUN1D4	DCUN1D4	DCUN1D4	DCUN1D4	
DPP8	DPP8	DPP8	DPP8	DPP8	DPP8	DPP8	DPP8	
ITGB4BP	ITGB4BP	ITGB4BP	ITGB4BP	ITGB4BP	ITGB4BP	ITGB4BP	ITGB4BP	
EPB41L1	EPB41L1	EPB41L1	EPB41L1	EPB41L1	EPB41L1	EPB41L1	EPB41L1	
ERBB2IP	ERBB2IP	ERBB2IP	ERBB2IP	ERBB2IP	ERBB2IP	ERBB2IP	ERBB2IP	
FBF1	FBF1	FBF1	FBF1	FBF1	FBF1	FBF1	FBF1	
GAB1	GAB1	GAB1	GAB1	GAB1	GAB1	GAB1	GAB1	
GEMIN7	GEMIN7	GEMIN7	GEMIN7	GEMIN7	GEMIN7	GEMIN7	GEMIN7	
GIT2	GIT2	GIT2	GIT2	GIT2	GIT2	GIT2	GIT2	
GRHL1	GRHL1	GRHL1	GRHL1	GRHL1	GRHL1	GRHL1	GRHL1	
DKFZP66M0199	DKFZP66M0199	DKFZP66M0199	DKFZP66M0199	DKFZP66M0199	DKFZP66M0199	DKFZP66M0199	DKFZP66M0199	
ITG21	ITG21	ITG21	ITG21	ITG21	ITG21	ITG21	ITG21	
HNRPAB	HNRPAB	HNRPAB	HNRPAB	HNRPAB	HNRPAB	HNRPAB	HNRPAB	
HP51	HP51	HP51	HP51	HP51	HP51	HP51	HP51	
IL1F7	IL1F7	IL1F7	IL1F7	IL1F7	IL1F7	IL1F7	IL1F7	
C14orf173	C14orf173	C14orf173	C14orf173	C14orf173	C14orf173	C14orf173	C14orf173	
IRF7	IRF7	IRF7	IRF7	IRF7	IRF7	IRF7	IRF7	
KIF9	KIF9	KIF9	KIF9	KIF9	KIF9	KIF9	KIF9	
LHX6	LHX6	LHX6	LHX6	LHX6	LHX6	LHX6	LHX6	
LLGL2	LLGL2	LLGL2	LLGL2	LLGL2	LLGL2	LLGL2	LLGL2	
LRP8	LRP8	LRP8	LRP8	LRP8	LRP8	LRP8	LRP8	
LRR23	LRR23	LRR23	LRR23	LRR23	LRR23	LRR23	LRR23	
MAPKAP1 (5)	MAPKAP1 (5)	MAPKAP1 (5)	MAPKAP1 (5)	MAPKAP1 (5)	MAPKAP1 (5)	MAPKAP1 (5)	MAPKAP1 (5)	
MAR2	MAR2	MAR2	MAR2	MAR2	MAR2	MAR2	MAR2	
MD01	MD01	MD01	MD01	MD01	MD01	MD01	MD01	
MRPL33	MRPL33	MRPL33	MRPL33	MRPL33	MRPL33	MRPL33	MRPL33	
MTMR3	MTMR3	MTMR3	MTMR3	MTMR3	MTMR3	MTMR3	MTMR3	
HEM12	HEM12	HEM12	HEM12	HEM12	HEM12	HEM12	HEM12	
NFATC2	NFATC2	NFATC2	NFATC2	NFATC2	NFATC2	NFATC2	NFATC2	
ODF2L	ODF2L	ODF2L	ODF2L	ODF2L	ODF2L	ODF2L	ODF2L	
OSBP9	OSBP9	OSBP9	OSBP9	OSBP9	OSBP9	OSBP9	OSBP9	
PAOX	PAOX	PAOX	PAOX	PAOX	PAOX	PAOX	PAOX	
PARL	PARL	PARL	PARL	PARL	PARL	PARL	PARL	
PDE9A	PDE9A	PDE9A	PDE9A	PDE9A	PDE9A	PDE9A	PDE9A	
PITPNC1	PITPNC1	PITPNC1	PITPNC1	PITPNC1	PITPNC1	PITPNC1	PITPNC1	
PLOD2	PLOD2	PLOD2	PLOD2	PLOD2	PLOD2	PLOD2	PLOD2	
POG2	POG2	POG2	POG2	POG2	POG2	POG2	POG2	
SMN2	SMN2	SMN2	SMN2	SMN2	SMN2	SMN2	SMN2	
LOC219854	LOC219854	LOC219854	LOC219854	LOC219854	LOC219854	LOC219854	LOC219854	
DKFZp7612123	DKFZp7612123	DKFZp7612123	DKFZp7612123	DKFZp7612123	DKFZp7612123	DKFZp7612123	DKFZp7612123	
ADAR1 (2)	ADAR1 (2)	ADAR1 (2)	ADAR1 (2)	ADAR1 (2)	ADAR1 (2)	ADAR1 (2)	ADAR1 (2)	
ADAR1 (4)	ADAR1 (4)	ADAR1 (4)	ADAR1 (4)	ADAR1 (4)	ADAR1 (4)	ADAR1 (4)	ADAR1 (4)	
C11orf17	C11orf17	C11orf17	C11orf17	C11orf17	C11orf17	C11orf17	C11orf17	
ANAPC11	ANAPC11	ANAPC11	ANAPC11	ANAPC11	ANAPC11	ANAPC11	ANAPC11	
APC	APC	APC	APC	APC	APC	APC	APC	
ARFIP1	ARFIP1	ARFIP1	ARFIP1	ARFIP1	ARFIP1	ARFIP1	ARFIP1	
ARHGAP11	ARHGAP11	ARHGAP11	ARHGAP11	ARHGAP11	ARHGAP11	ARHGAP11	ARHGAP11	
ATG16L1	ATG16L1	ATG16L1	ATG16L1	ATG16L1	ATG16L1	ATG16L1	ATG16L1	
ATP2A1	ATP2A1	ATP2A1	ATP2A1	ATP2A1	ATP2A1	ATP2A1	ATP2A1	
BTC	BTC	BTC	BTC	BTC	BTC	BTC	BTC	
CD151	CD151	CD151	CD151	CD151	CD151	CD151	CD151	
CDKSRAP2	CDKSRAP2	CDKSRAP2	CDKSRAP2	CDKSRAP2	CDKSRAP2	CDKSRAP2	CDKSRAP2	
CLK1	CLK1	CLK1	CLK1	CLK1	CLK1	CLK1	CLK1	
DTNB	DTNB	DTNB	DTNB	DTNB	DTNB	DTNB	DTNB	
ECT2	ECT2	ECT2	ECT2	ECT2	ECT2	ECT2	ECT2	
FAM68A	FAM68A	FAM68A	FAM68A	FAM68A	FAM68A	FAM68A	FAM68A	
FOXJNSR	FOXJNSR	FOXJNSR	FOXJNSR	FOXJNSR	FOXJNSR	FOXJNSR	FOXJNSR	
KCNAB2	KCNAB2	KCNAB2	KCNAB2	KCNAB2	KCNAB2	KCNAB2	KCNAB2	
LOMR3	LOMR3	LOMR3	LOMR3	LOMR3	LOMR3	LOMR3	LOMR3	
MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	MAPKAP1 (3)	
MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	
MEIS2	MEIS2	MEIS2	MEIS2	MEIS2	MEIS2	MEIS2	MEIS2	
MKNK1	MKNK1	MKNK1	MKNK1	MKNK1	MKNK1	MKNK1	MKNK1	
MTMR2	MTMR2	MTMR2	MTMR2	MTMR2	MTMR2	MTMR2	MTMR2	
NDL1	NDL1	NDL1	NDL1	NDL1	NDL1	NDL1	NDL1	
NFATS (1)	NFATS (1)	NFATS (1)	NFATS (1)	NFATS (1)	NFATS (1)	NFATS (1)	NFATS (1)	
NFATS (3)	NFATS (3)	NFATS (3)	NFATS (3)	NFATS (3)	NFATS (3)	NFATS (3)	NFATS (3)	
NKTR	NKTR	NKTR	NKTR	NKTR	NKTR	NKTR	NKTR	
OSBP3	OSBP3	OSBP3	OSBP3	OSBP3	OSBP3	OSBP3	OSBP3	
PALM	PALM	PALM	PALM	PALM	PALM	PALM	PALM	
PML	PML	PML	PML	PML	PML	PML	PML	
POLB	POLB	POLB	POLB	POLB	POLB	POLB	POLB	
HSPD2A	HSPD2A	HSPD2A	HSPD2A	HSPD2A	HSPD2A	HSPD2A	HSPD2A	
FOXSYNE2	FOXSYNE2	FOXSYNE2	FOXSYNE2	FOXSYNE2	FOXSYNE2	FOXSYNE2	FOXSYNE2	
OATL1	OATL1	OATL1	OATL1	OATL1	OATL1	OATL1	OATL1	

		Taux naturel d'altération de l'épissage alternatif (14 jours de passages cellulaires)	
HCT 116	Clone 1	35/96	25,3 % ± 5,3 %
	Clone 2	16/96	
	Clone 3	15/96	
	Clone 4	31/96	

		Taux naturel d'altération de l'épissage alternatif (14 jours de passages cellulaires)	
HIEC	Clone 1	20/96	25,3 % ± 2,3 %
	Clone 2	26/96	
	Clone 3	27/96	

Figure 1 : Altération des profils d'épissage au cours du temps dans des cellules en culture. Résultats de l'analyse de RT-PCR de (A) 192 ASEs classiques (exons cassettes), (B) 116 ASEs classiques liés par TDP-43 et (C) de ASEs contenant des VNTRs suite à 42 jours (A et C) ou 48 jours (B) de croissance en culture où les HCT116 ont uniquement subi des passages cellulaires. (D) Analyse de 96 ASEs classiques suite à 14 jours de croissance où les HCT116 et les HIEC ont uniquement subi des passages cellulaires.

l'analyse avec une lignée de cellules normales, les HIEC (cellules épithéliales de la crypte intestinale embryonnaire). Après 14 jours de croissance, des altérations dans les profils d'épissage de 96 événements de la liste originale de 192 ASEs utilisée précédemment ont été notées dans $25,3\% \pm 2,3$ de celles-ci, une valeur équivalente à celle obtenue pour les HCT116 dans cette reprise ($25,3\% \pm 5,3\%$, valeur P: 0,495) (Fig. 1D). Au cours de cette période de temps, le nombre de divisions cellulaires, estimé à partir du temps de doublage, entre les lignées cellulaires était comparable (12,45 pour HIEC vs 12,02 pour HCT116). Ainsi, cette altération des profils d'épissage semble une caractéristique commune aux cellules en culture, qu'elles soient cancéreuses ou non.

Accentuation des altérations maintenues de profil d'épissage par des vagues de déplétion de RNPS1

Sachant que les profils d'épissage changent naturellement et que ce niveau d'altération varie selon la classe d'ASEs étudiés, nous avons souhaité déterminer s'il était possible de moduler cette altération en augmentant l'instabilité génomique dans la cellule. Parmi les multiples moyens à notre disposition, nous avons choisi d'accroître l'instabilité génomique par la déplétion de protéines liant l'ARN (RBPs). En effet, la réduction du niveau d'expression de RBPs, telles que les facteurs d'épissage comme SRSF1 et RNPS1 peut accroître l'instabilité génomique (Li and Manley 2005; Li et al. 2007). Le mécanisme menant à cette instabilité n'a pas été complètement cerné, mais pourrait impliquer la formation de la structure hybride ARN-ADN (R-loop) puisque cette instabilité génomique est diminuée lorsque la RNase H (qui détruit les R-loops) est exprimée. Ainsi, nous envisageons que la formation de R-loops, au travers d'un défaut de couverture appropriée du pré-ARNm par les RBPs, pourraient entraîner des dommages à l'ADN préférentiellement dans des régions normalement liées par ces facteurs et impliquées dans le contrôle de l'épissage alternatif, que ce soit par exemple des sites de liaisons pour des facteurs d'épissage ou les sites d'épissage même situés à l'embranchement des exons et des introns. Ces altérations à l'intégrité génomique, si non réparées adéquatement et converties en dommages double brins, produiront des mutations qui seront perpétuées lors des prochains cycles de réplication. Lors de la transcription, ces pré-ARNm mutés pourraient ainsi voir leur profil d'épissage altérés par rapport au pré-ARNm original (Fig. 2A).

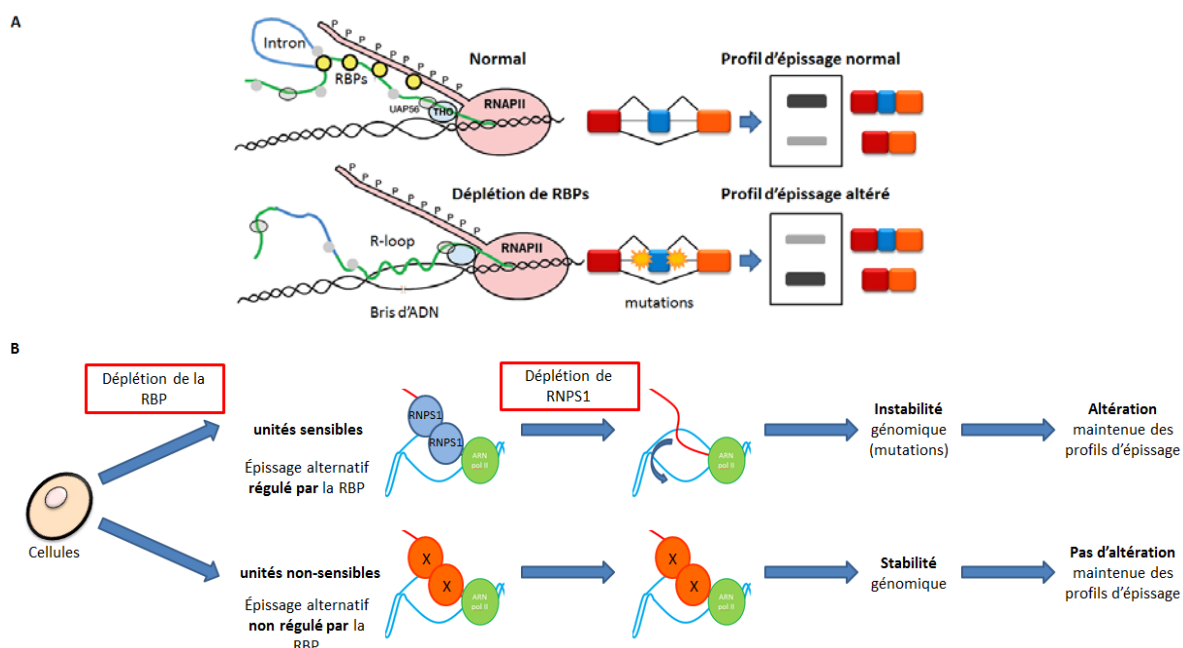


Figure 2: Instabilité génomique par la formation de R-loop. (A) La couverture appropriée du pré-ARNm naissant par les RBPs empêche celui-ci de s'hybrider avec le brin d'ADN complémentaire, prévenant ainsi la formation de l'hybride d'ARN-ADN (R-loop) et les dommages d'ADN subséquents. Par conséquent, la déplétion de RBPs, au travers de la formation de R-loop, peut résulter en une altération des profils d'épissage si les mutations potentielles (résultant des dommages à l'ADN) surviennent dans des régions importantes pour la régulation de l'épissage (Adapté d'Aguilera 2005). (B) L'impact de plusieurs vagues de déplétions du facteur d'épissage sur la régulation de leur épissage alternatif devrait être différent pour chaque catégorie d'ASE (sensible et non-sensible) dû à une différence dans le recouvrement protéique. Par conséquent, la déplétion des RBPs, au travers de la formation de R-loop, devrait résulter en une altération des profils d'épissage spécifiquement chez les ASEs sensibles.

Les ASEs sélectionnés dans cette étude seront divisés en deux catégories distinctes, soit ceux sensibles à la déplétion transitoire du régulateur et ceux non-sensibles. L'impact de plusieurs vagues de déplétions du facteur d'épissage sur la régulation de leur épissage alternatif devrait être différent pour chaque catégorie d'ASE. Ainsi, puisque la liaison du régulateur à un ASE sensible ou non-sensible est différente, il y aura donc une différence dans la capacité à former les R-loops suite à la déplétion du régulateur entre ces deux catégories d'événements (Fig. 2B). Les ASEs non sensibles, puisque non régulés par le facteur d'épissage et donc non couverts par le régulateur, ne devraient pas voir de modification de leur couverture protéique. Ces ASEs ne devraient donc pas voir leur profil d'épissage altéré par ces déplétions transitoires et devrait produire un taux d'altérations équivalant à celui du bruit de fond, soit l'altération naturelle des profils d'épissage avec le

temps. Au contraire, chez les ASEs sensibles, la formation de R-loops devrait accentuer ce taux d'altération.

Parmi les protéines dont la déplétion a été montrée comme introduisant de l'instabilité génomique, nous avons opté pour les facteurs d'épissage RNPS1 et TDP-43. RNPS1 (*RNA-binding protein with serine-rich domain 1*) est un membre de famille élargie des protéines SR et une protéine accessoire du complexe EJC impliquée dans la dégradation des ARNm (NMD) (Le Hir et al. 2000). À titre de membre du complexe ASAP, RNPS1 est impliqué dans l'induction de l'apoptose cellulaire (Schwerk et al. 2003). Un rôle comme régulateur général de l'épissage (constitutif) fut attribué à la protéine RNPS1 avant la découverte de son implication dans la régulation de l'épissage alternatif de certaines constructions artificielles d'abord, puis d'un événement endogène particulier, le régulateur apoptotique Bcl-x (Mayeda et al. 1999; Wang et al. 2002; Sakashita et al. 2004; Michelle et al. 2012). Lorsque la protéine RNPS1 est surexprimée, celle-ci prévient l'accroissement de l'instabilité génomique induite la perte du facteur d'épissage SRSF1. Non seulement celle-ci compense la perte de SRSF1, mais sa déplétion induit une augmentation de la fragmentation accrue de l'ADN génomique, signe d'une instabilité génomique accrue (Li et al. 2007). Cela a permis d'élaborer l'hypothèse selon laquelle ces deux protéines travaillent de concert pour former, avec le pré-ARNm naissant, un complexe RNP ou ribonucléoprotéique qui protège le transcrit et prévient la formation de R-loops néfastes. Dans le cas de la protéine TDP-43 (*TAR-DNA binding protein 43*), facteur d'épissage membre de l'autre grande famille de facteurs d'épissage (protéines hnRNP), celle-ci joue un rôle clé dans le développement de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et de la dégénérescence lobaire fronto-temporale (DLFT), ainsi que dans la répression de la transcription du VIH (Neumann et al. 2006). Lorsque le niveau d'expression de TDP-43 est réduit dans les cellules HeLa, un accroissement de la phosphorylation de l'isoforme γ -H2AX et de la fragmentation de l'ADN génomique est observé, signes d'instabilité génomique (Ayala et al. 2008). Au contraire de RNPS1, le site de liaison de TDP-43 au niveau de l'ARN est connu, soit une série de répétitions consécutives du dinucléotide UG (Buratti et al. 2001).

Le niveau d'expression de ces facteurs d'épissage sera réduit au travers de l'induction par la doxycycline d'un shRNA contre ceux-ci (Barbier et al. 2007). La catégorisation (sensibles VS non sensibles) des ASEs est effectuée par la déplétion transitoire des protéines via l'induction du shRNA sur une période de 7 jours afin de s'assurer d'une déplétion optimale des protéines. L'efficacité de la déplétion fut vérifiée par immunobuvardage de type western pour le facteur d'épissage TDP-43 (Fig. 3C) et par PCR en temps réel pour la protéine RNPS1 (chiffrée à au moins 50% pour ce facteur dans l'ensemble des clones) (Fig. 3A). Pour s'assurer que le niveau de déplétion de la protéine RNPS1 est suffisant pour observer un changement significatif au niveau de la régulation d'événements d'épissage alternatif, l'impact de cette déplétion sur la régulation de l'épissage alternatif de deux événements connus comme étant régulés par le facteur d'épissage, à savoir SLIT2 et Bcl-x, a été analysé (Michelle et al. 2012). On peut observer que dans les quatre clones, la déplétion a engendré une différence significative d'au moins 10 % pour les deux événements (Fig. 3B).

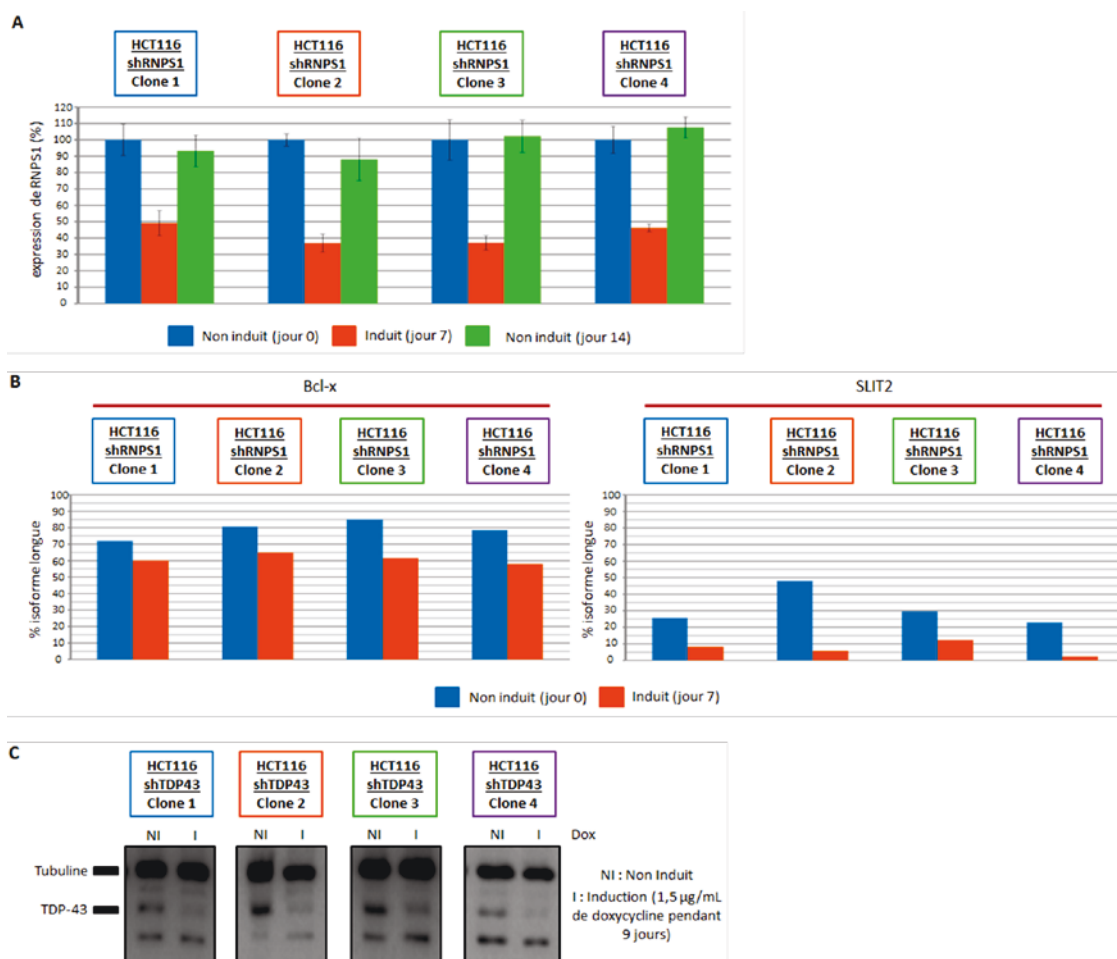


Figure 3 : Établissement des lignées HCT116 shRNPS1 et HCT116 shTDP-43. (A) Niveau d'expression par RT-qPCR (normalisé avec contrôle interne) de l'ARNm de RNPS1 dans des cellules HCT116 shRNPS1 induites (B) Essais de RT-PCR pour les unités Bcl-x et SLIT2 sur l'ARN total extrait de cellules HCT116 shRNPS1 induites (C) Niveau d'expression de la protéine TDP-43 détecté par immunobuvardage de type Western (utilisant α -tubuline et α -TDP-43) dans des cellules HCT116 shTDP-43 induites.

Ainsi, après 7 jours d'induction du shRNA, on peut constater que le tiers ($32,2\% \pm 6,0\%$) des 192 ASEs classiques et aussi des événements comprenant des VNTRs ($34,4\% \pm 15,7\%$) ont vu leur profil d'épissage altéré par la déplétion transitoire de RNPS1 et donc sont possiblement régulés par cette RNPS1 (Fig. 4B et 4D). Du côté de TDP-43, 96 des 116 ASEs liés par cette protéine, environ la moitié d'entre eux ($54,4\% \pm 8,4\%$) ont subis une altération. Nous constatons que 50% des ASEs réactifs le sont dans au moins deux clones sur quatre, ce qui indique une bonne reproductibilité des résultats entre les quatre clones pour les deux facteurs d'épissage étudiés (Voir annexe, Fig. suppl. 1).

Ayant trié les ASEs selon leur réponse à une déplétion transitoire des facteurs d'épissage, la prochaine étape consiste à déterminer combien de ceux-ci pour chacune des catégories vont subir une altération de leur profil d'épissage après plusieurs rondes de déplétions et un rétablissement des niveaux normaux de ces facteurs. Les cellules HCT116 sont donc soumises à plusieurs rondes de déplétions contre RNPS1 ou TDP-43. Une ronde de déplétion consiste à induire, comme précédemment, pendant une période de 7 jours le shRNA contre les facteurs d'épissage et, par la suite, à laisser récupérer les cellules par l'arrêt de l'induction pour une période de temps quasi-équivalente (7 jours pour RNPS1, 9 jours pour TDP-43). Les clones vont subir trois rondes successives de déplétions, et au bout d'environ un mois (42 jours pour RNPS1, 48 jours pour TDP-43), l'ARN de ces cellules sera extrait. Au terme de la troisième et dernière ronde de déplétion, l'induction du shRNA sera terminée depuis 7 jours et le niveau d'expression des facteurs d'épissage sera donc rétabli. Ainsi, tout effet sur le profil d'épissage des ASEs analysés ne peut être dû à l'absence de la protéine.

Suite à près d'un mois de vagues de déplétion de RNPS1, l'altération permanente des profils d'épissage pour les unités non sensibles ($23,4\% \pm 2,2\%$) est équivalente à celle du changement naturel reporté plus haut ($27,5\%$, valeur P: 0,178) (Fig. 4B). Par rapport au taux naturel et au taux des ASEs non-sensibles à RNPS1, la déplétion de RNPS1 a doublé

A	1	2	3	4	1	2	3	4
BTIC	BTIC	FOX.SYNE2	C11orf17		PCBP2 (2)	INCENP	ECHDC1	INCENP
FOX.SYNE2	FOX.SYNE2	ARIP1	BRD8 (2)		LRDD	MC11	FUJ1151	NCQ1
ARHGAP17	CAMK2	C1orf17	NCQ1		LOC643446	WDR1	BRD8 (2)	NCQ1
C1orf17	CENTG2	CENTG2	ISL1		RSU1	NUP98	STAT3	PCBP2 (2)
CENTG2	DKFZp761j12123	HP51	LRP8		SEC23B	PCBP2 (2)	APTX	POT1
PITPNC1	NKTR	LRP8	NFATS (1)		UBE2D3	LRDD	ATPAF1	SIABBP1
ECT2	CD151	NFATS (3)	NFATS (3)		PRKCBP1 (1)	POT1	BCLAF1	RBBP8
MRD1	PDERA	DTNB	PALM		CES2	RBBP8	C14orf159 (3)	LOC643446
MRPL33	C1orf66	APRT	ARHGAP17		C11orf17	LOC643446	C17orf80	RSU1
EHMT2	C1orf17	ACOT9	FAM68A		PLOD2	LOC643446	CLL1	SEC23B
GABPA3	PRKCBP1 (3)	EHMT2	PLOD2		ABR1	SEC23B	OSR1	C14orf159 (3)
MGCS5875	VKORC1	HNRNP33	APRT		CDK5RAP2	C14orf159 (3)	DCUNE3C	UBE2D3
PRKCBP1 (3)	ZFYVE27	MGCS5875	C21orf66		LOHNF3	UBE2D3	GEM	WDR1
FUJ1151	APTX	SNRPB2	DUSP6		LRRC23	WAC	GTDC1	ZNF621
RAP1GDS1	TMEM22	ATP2C1	ECHDC1		ACOT9	WDR1	GTPBP8	CES2
UEVLD	PALM	DUSP6	TRAPP68		CDK5C	ZNF621	MC11	CTBP1
CLTCL1	BRNBP1	RAP1GDS1	CASP8		APAF1	CES2	NCQ1	APC
GGA1	COL13A1	UEVLD	PCBP2 (1)		ACLY	PAOX	NUP98	PAOX
GMEB1	DMB1	FANCA	IKZF2		BCLAF1	GAB1	PCBP2 (2)	IBF7
FAM33A	ITGA6	SEC23B	FOX.INSR		ERP29	CLTCL1	POT1	CLTCL1
FRF1	POLB	C11orf17	HNRNP33		DKFZP564J102	FRF1	SIABBP1	ADAR1 (2)
HEM12	ADAR1 (2)	MEIS2	PPI2		GTDC1	IRF7	RBBP8	ADNP
KIF9	ANAPC11	C16orf13	WBP5		ILK	LOHNF3	LOC643446	EBR2IP
MDK3	APB1	TRAPP68	FUJ1151		POT1	LOC643446	RSU1	LOHNF3
MT	ARHGAP17	BTIC	MGCS5875		PPARG	DCUNE3C	FAM33A	ALDH3B1
C11orf66	NFATS (3)	ADAR1 (2)	SCMH1		RBBP8	EHMT2	C14orf159 (3)	EHMT2
HNRNP33	ATG16L1	CDK5RAP2	DMB1		C14orf61	APAF1	UBE2D3	TRP1
LRRC20	ILG12	GIT2	RASA4		WARS	C14orf159 (2)	WDR1	ERP29
SNRPB2	MTMR2	PALM	RSR2		ZNF621	RSR2	PRKCBP1 (1)	DKFZP564J102
C16orf13	PALM	BAZ1A	BTIC		DKFZP761J12123	TRAPP68	ZNF621	MC11
RASA4	BRNBP1	C16orf13	RBBP8		LRP8	HNRNP33	CES2	LRDD
RBBP8	LRRC20	MADD	PITPNC1		NKTR	PCBP2 (1)	PALM	VPS29
STAT3	FOX.INSR	PPP1CB	BAZ1A		ADNP	PPARG	FRF1	GTF2I
MC11	HISPPD2A	PRKCBP1 (3)	ACOT9		EBR2IP	SIABBP1	KIF9	POLB
POLB	MAPKAP1 (5)	VKORC1	PPP1CB		ILG12	FAM33A	ANAPC11	ANAPC11
ANAPC11	APRT	APAF1	APAF1		MTMR2	CLK1	LOC219854	CDK5RAP2
CLK1	ALDH3B1	C14orf159 (2)	ATP2C1		ATP55	LRP8	CLK1	FRF1
NFATS (3)	MGCS5875	ITGA6	RBBP8		DTNB	MT	GTF2IPD1	HISPPD2A
OSBP13	PPI2	KTN1 (1)	TMLU2		EPB4113	PML	ATP2A1	MDK1
PALM	PPP1CB	MRPL55	UEVLD		GEMIN7	HNRNP33	TMEM22	MAPKAP1 (5)
PAOX	SCMH1	RUSC1	GEM		HNRNP33	NFATC2	CASC4	AMACR
MTMR3	WBP5	GTDC1	GTDC1		ODF2L	RASA4	KTN1 (2)	MAR2
SMN2	C16orf13	WAC	WAC		OSBP13	TMLU2	RASA4	NDEL1
APRT	C16orf13	FOX.SYNE2	FOX.SYNE2		BAZ1A	BCLAF1	RSR2	FOXPA
GTF2IPD1	DUSP6	ABR1	VKORC1		MDK3	ACLY	CASP8	FAM33A
PPP1CB	APCS1	ARIP1	C1orf17		C17orf80	GTDC1	VPS29	CAMK2
C14orf159 (2)	KIF9	ABCD4	DKFZP761J12123		HNRNP33	WARS	FOXPA	CLK1
DUSP6	OAT11	LRRC23	DKFZP761J12123		WAC	PRKCBP1 (1)	GGA1	MEIS2
ECHDC1	IL1F7	ALDH3B1	GIT2		WDR1	MKNK1	GMEB1	MKNK1
RUSC1	C11orf17	CDK25C	CDK25C		IKZF2	APC	IL28RA	NKTR
TMEM22	ABR1	COL13A1	COL13A1		DNCR	ATP2A1	INCENP	CTD2
DCAT1C	ARIP1	TNFR3	GTF2IPD1		HISPPD2A	NFATS (1)	PCBP2 (1)	ATG16L1
IL28RA	BRD8 (2)	LRRC20	MADD		OAT11	CDK25C	PPARG	ILG12
NQO1	C1orf17	PHL2	SNRPB3		KCNAB2	MADD	WAC	MTMR2
FOX.INSR	CDK5RAP2	SCMH1	VKORC1		ATG16L1	TRP1	FOX.INSR	PALM
ADAR1 (2)	GIT2	TRP1	C14orf159 (2)		BRD8 (4)	IKZF2	NFATS (1)	CLCN6
ATP2A1	HEM12	C1orf13	C1orf13		CLCN6	KTN1 (2)	NKTR	NFATC2
MKNK1	HP51	ITGA6	ITGA6		CLCN6	TRP1 (1)	PAOX	LRRC20
NFATS (1)	UEVLD	RBBP8	RBBP8		RBBP8	MRPL55	SMN2	ILK
ASR3	MAPKAP1 (3)	TMUB2	MRPL55		APTX	DCUNE3C	HNRNP33	APTX
PML	MEIS2	ERP29	RBBP8		SIABBP1	DIAPH1	ILK	PRKCBP1 (1)
COL13A1	OSBP13	LRDD	ZFYVE27		VPS29	GGA1	VPS29	
PPI2	PITPNC1	WARS						
TRP1	ADNP							
C1orf13	DKFZP66M0199	APC	CRK					
DMB1	CTP1	BR7	PPARG					
ITGA6	ITGA6BP	MAPKAP1 (3)	ITGA6					
KTN1 (2)	KCNAB2	OAT11	APGSL					
MRPL55	ECT2	IL1F7	GAB1					
RSR2	ASR3	ILK6	TMEM22					
TMUB2	MRD1	PITPNC1	APB1					
	MRPL33	ATP55	ARHGAP17					
LOC219854	MTMR3	APGSL	ATP2A1					
BRD8 (2)	SMN2	ABR1	CENTG2					
APGSL	ARHGAP17	APB1	KIF9					
IRF7	FAM68A	ARHGAP17	ILK6					
APC	PLOD2	BRD8 (2)	MAPKAP1 (3)					
MAPKAP1 (3)	ABCD4	CAMK2	OAT11					
ARIP1	ATP55	HISPPD2A	OSBP13					
APB1	HEM12	DKFZP66M0199	DKFZP66M0199					
CAMK2	EPB4113	MKNK1	ITGA6BP					
GIT2	ADAR1 (4)	OSBP13	KCNAB2					
HP51	AMACR	PAOX	ASR3					
IL1F7	AP3M1	ADNP	LOC219854					
DKFZP66M0199	BOLA3	DKFZP66M0199	MRPL33					
GTF2I	BRD8 (4)	GTF2I	MT					
ITGA6BP	BTN3A3	ITGA6BP	MTMR3					
CD151	BTIC	KCNAB2	PML					
MAPKAP1 (5)	CASC4	ECT2	SMN2					
PALM	CLCN6	ASR3	CD151					
PDERA	CTBP1	MRD1	PDERA					
ARHGAP17	DCUN1D4	MRPL33	ABCD4					
FAM68A	DPP8	MT	ATP55					
GAB1	GEMIN7	MTMR3	DTNB					
ABCD4	GRH1	ATG16L1	LRRC23					
ADAR1 (4)	C14orf173	CD151	EPB4113					
AMACR	MAR2	EBR2IP	ADAR1 (4)					
AP3M1	NDEL1	ILG12	BTN3A3					
BOLA3	ODF2L	LOHNF3	BOLA3					
BTN3A3	OSBP13	MAPKAP1 (5)	BRD8 (4)					
97NC	POG2	POG2A	BTN3A3					
CASC4	BAZ1A	ARHGAP17	BTIC					
CTBP1	ACOT9	FAM68A	CASC4					
DCUN1D4	ENO3	GAB1	DCUN1D4					
DPP8	GABP2	PLOD2	DPP8					
GRH1	SNRPB2	EPB4113	GEMIN7					
C14orf173	ATP2C1	ADAR1 (4)	GRH1					
NDEL1	ECDC1	AMACR	HNRNP33					
NFATC2	FUJ1151	AP3M1	C14orf173					
POG2	KTN1 (1)	BOLA3	ODF2L					
ALDH3B1	RAP1GDS1	BRD8 (4)	OSBP13					
MADD	RBBP8	BTN3A3	POG2					
SCMH1	STAT3	BTIC	ENO3					
WBP5	UEVLD	CLCN6	GABP2					
ATP2C1	ACLY	CTBP1	PRKCBP1 (3)					
KTN1 (1)	ATPAF1	DCUN1D4	RAP1GDS1					
TRAPP68	C14orf159 (3)	DPP8	APTX					
ATPAF1	C17orf80	GEMIN7	ATPAF1					
C14orf159 (3)	CASP8	GRH1	BCLAF1					
CRK	CRK	C14orf173	C14orf159 (3)					
DIAPH1	DKFZP564J102	MAR2	C17orf80					
FANCA	FANCA	MDK1	DCUNE3C					
FOXPA	FOXPA	NFATC2	DIAPH1					
GEM	GEM	ODF2L	FANCA					
GTPBP8	GMEB1	OSBP13	GMEB1					
INCENP	GTPBP8	POG2	GTPBP8					
NUP98	IL28RA	C21orf66	HNRNP33					
PCBP2 (1)	ILK	WBP5	IL28RA					

Nb d'ASEs sensibles (RNPS1) Taux d'altération maintenue des profils d'épissage (42 jours de vagues de déplétion)

Clone 1	71	37/71	
Clone 2	45	25/45	
Clone 3	64	40/64	
Clone 4	67	38/67	

56,7 % ± 2,2 %

Nb d'ASEs non-sensibles Taux d'altération maintenue des profils d'épissage (42 jours de vagues de déplétion)

Clone 1	121	35/121	
Clone 2	147	29/147	
Clone 3	128	26/128	
Clone 4	125	31/125	

23,4 % ± 2,2 %

Changement Aucun changement Sensibles Non-Sensibles

B	1	2	3	4
WBPS		GPBP1L1	CLIP1	DDR1
ATP2C1		OGT	OGT	FAM114A2
GPBP1L1		ZNF92	BC12L11	GPBP1L1
ZNF92		MEF2D	MEF2D	MEF2D
FAM114A2		RGL1	RABGEF1	OGT
RABGEF1		SUN1	RGL1	PUM1
SUN1		RWDD1	RWDD1	TRAPPC9
RWDD1		RAP1GAP2	UBTF	ATP11C
UBTF		NCOR1	CDK5RAP2	CDK5RAP2
ARMKCB		DDR1	PALM	DOGAP
CSNK1A1		PDPK1	MAPT	IGSF3
MPZL1		UBTF	MAPK14	INP1
RP524		HNRNPAB	SENPG	PLCB1
TCEAL8		ZRANB2	ASAP2	POLDIP3
PRR3		ARL13B	GT3C2	RWDD1
KIF1B		MOB4	ATG9A	WBPS
TIA1		CHKA	SOD2	EIF4H
FOXJNSR		ASAP2	DAG1	ANKRD12
NCOR1		FOXJNSR	FAM114A2	ATP2C1
SRSF2		SRSF2	LSM14A	RP524
TRAPPC9		TRAPPC9	NOTCH3	SENPG
KCNQ3		AP251	PIR8	STAG2
MAPK8IP3		ARMKCB	SLC9A8	UBTF
FAM1160A2		CSNK1A1	SNHG17	ZNF92
SERPINB8		KCNQ3	SUN1	BTIC
BC12L11		MAPK8IP3	ARRB1	KCNQ3
DAG1		MPZL1	CSNK2A1	MRPL24
LSM14A		OSBP15	AGBL5	ST7
MEF2D		ST7	HDAC7A	GT2IRD1
PIR8		FAM1160A2	MADD	SCRIB
SLC9A8		PIR8	MRPL4	BC12L11
SNHG17		SERPINB8	POLDIP3	CENPO
ARRB1		SOD2	RNF14	DAG1
CDK5RAP2		BC12L11	SCRIB	HNRNPAB
CSNK2A1		DAG1	TCEAL8	MAST2
AGBL5		FAM114A2	EIF4H	PIR8
HDAC7A		LSM14A	RAP1GAP2	RABGEF1
MADD		PIR8	NR6A1	SLC9A8
MRPL24		RABGEF1	PEL3	SNHG17
POLDIP3		SLC9A8	PRR3	STARD4
RNF14		SNHG17	SGSM2	SUN1
SCRIB		ARRB1	TMEM55B	ARRB1
EIF4H		CDK5RAP2	TPD52L2	ATPEV08
RAP1GAP2		CSNK2A1	LMN1	BRD8 (2)
NR6A1		ACR15	ATP2C1	CTTN
SGSM2		HDAC7A	ATPEV08	AGBL5
TMEM55B		MADD	BRD8 (2)	HDAC7A
TPD52L2		MRPL24	BTIC	KCNQ3
OPRL1		POLDIP3	CHKA	MPZL1
RGL1		RNF14	CNTFR	OSBP15
CASP9		SCRIB	COL4A3BP	ARL13B
PIR8		TCEAL8	CTTN	ATG9A
ATG9A		EIF4H	DDR1	FAM1160A2
KCNQ3		NR6A1	DOX47	MAPK14
INP1		PEL3	DTNB	PEL3
PEL3		PRR3	GEMIN7	PRR3
ATP11C		SGSM2	GPBP1L1	SGSM2
ATPEV08		TMEM55B	GPBP1L1	TIA1
BTIC		TPD52L2	HCM1R2	TMEM55B
CLIP1		PLCB1	HP1BP3	CLIP1
CNTFR		OPRL1	IGSF3	MAPT
COL4A3BP		NOTCH3	KCNQ3	ASAP2
DOX47		KCNQ3	KIF1B	GT3C2
GEMIN7		INP1	KIHL5	SOD2
GP98B		ATP2C1	MAPK8IP3	LSM14A
GT2IRD1		ATPEV08	NAV2	NOTCH3
HOMTR2		CNTFR	NCOR1	RGL1
HP1BP3		COL4A3BP	NSL1	CSNK2A1
IGSF3		CTTN	NUP35	PALM
KIHL5		DOX47	PDPK1	TCEAL8
MYADM		DTNB	PLCB1	RAP1GAP2
NAV2		GEMIN7	RM38	NR6A1
NRD1		HMGB2	ST7	TPD52L2
NSL1		HP1BP3	STAG2	CHKA
NUP35		IGSF3	SYF2	CNTFR
OGT		KIHL5	TCF20	COL4A3BP
PUM1		MAPK14	TRAPPC9	DTNB
RBM38		NSL1	WBPS	GEMIN7
SMARCA2		NAV2	ZNF92	GP98B
STAG2		NRD1	XRCC4	MYADM
SYF2		NSL1	CASP9	NRD1
XRCC4		NUP35	OPRL1	KIF1B
YTHDC1		RM38	SNUPN	KIHL5
SNUPN		SENPG	KCNQ3	MAPK8IP3
FW5R1		SMARCA2	ATP11C	NAV2
AP251		SMN2	NSL1	NSL1
ACLY		STAG2	ZRANB2	NUP35
BRCA1		STARD4	BRCA1	RBM38
CHKA		SYF2	GT2IRD1	SYF2
CTTN		XRCC4	MOB4	TCF20
DTNB		YTHDC1	MYADM	ZRANB2
MAPK14		GP98B	NRD1	BRCA1
MOB4		CASP9	SMARCA2	MOB4
SENPG		SNUPN	YTHDC1	MYADM
SMN2		PALM	ACLY	NRD1
ST7		BTIC	ANKRD12	SMARCA2
GT3C2		GT2IRD1	AP251	XRCC4
NSL1		MAST2	ARL13B	YTHDC1
TCF20		PUM1	ARMKCB	ACLY
BRD8 (2)		GT3C2	CENPO	AP251
OSBP15		ACLY	CREBBP	ARMKCB
NOTCH3		ANKRD12	CSNK1A1	CASP9
PALM		ATG9A	EW5R1	CREBBP
ANKRD12		ATP11C	FAM1160A2	CSNK1A1
ARL13B		BRCA1	HNRNPAB	EW5R1
ASAP2		BRD8 (2)	FOXJNSR	FOXJNSR
CENPO		CLIP1	MAST2	OPRL1
CREBBP		CLIP1	MPZL1	SERPINB8
DDR1		CREBBP	OSBP15	SMN2
HNRNPAB		FW5R1	PUM1	SNUPN
MAPT		KIF1B	RP524	NCOR1
MAST2		MAPT	SERPINB8	PDPK1
PDPK1		MYADM	SMN2	MADD
SOD2		TCF20	SRSF2	RNF14
STARD4		TIA1	STARD4	MSL1
ZRANB2		WBPS	TIA1	SRSF2

	Nb d'ASEs sensibles (TDP-43)	Taux d'altération maintenue des profils d'épissage (48 jours de vagues de déplétion)	
Clone 1	48	33/48	
Clone 2	59	50/59	71,3 % ± 7,1 %
Clone 3	43	34/43	
Clone 4	59	31/59	

	Nb d'ASEs non-sensibles (TDP-43)	Taux d'altération maintenue des profils d'épissage (48 jours de vagues de déplétion)	
Clone 1	68	21/68	
Clone 2	57	17/57	26,9 % ± 7,0 %
Clone 3	73	29/73	
Clone 4	57	4/57	

 Changement
  Aucun changement
  Sensibles
  Non-Sensibles

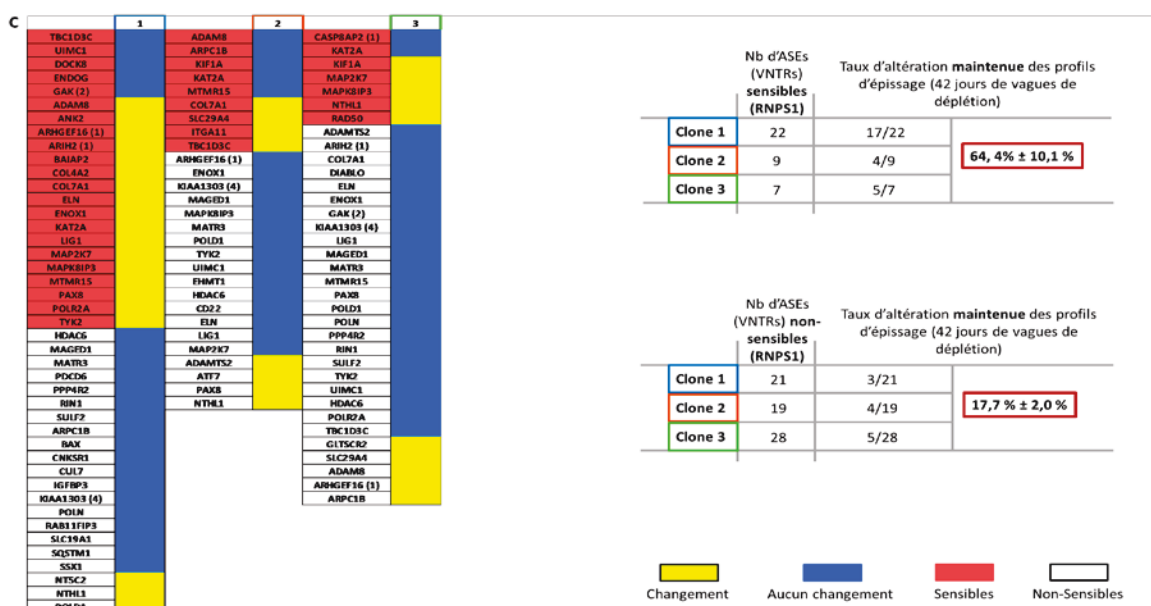


Figure 4: Altération maintenue du profil d'épissage des unités sensibles suite à plusieurs vagues de déplétion. Résultats de l'analyse RT-PCR de (B) 192 ASEs classiques (exons cassettes), (C) 116 ASEs classiques liées par TDP-43 et (D) d'ASEs contenant des VNTRs suite à 42 jours (A et C) ou 48 jours (B) de croissance en culture où les HCT116 ont subi trois vagues de déplétion (7 jours de shRNA suivi de 7 jours d'arrêt pour RNPS1 et 7 jours de shRNA suivi de 9 jours d'arrêt pour TDP-43).

l'altération des profils d'épissage pour les événements sensibles ($56,7\% \pm 2,2\%$, valeur P: 0,0001; Fig. 4B). Ainsi, cette accentuation de l'altération permanente est spécifique à une classe d'ASEs, celle régulée par cette protéine *SR-like*. Pour les ASEs sensibles contenant des VNTRs, la déplétion de RNPS1 accentue l'altération du profil d'épissage à $64,4\% \pm 10,1\%$ (comparé à $47,5\% \pm 15,8\%$, valeur P: 0,210) (Fig. 4D). Cette accentuation dans le cas des ASEs VNTRs est encore une fois spécifique à la classe d'événements dont l'épissage est régulé par RNPS1 ($64,4\% \pm 10,1\%$ pour les ASEs sensibles vs $17,7\% \pm 2,0\%$ pour les unités non sensibles, valeur P: 0,005) (Fig. 4D). Du côté de la protéine hnRNP TDP-43, la déplétion de ce facteur d'épissage a accentué, mais d'un facteur moindre comparativement à RNPS1, l'altération permanente des profils d'épissage de ces ASEs sensibles ($71,3\% \pm 7,1\%$ vs $50,2\% \pm 6,0\%$, valeur P: 0,032) et ce, de manière spécifique ($71,3\% \pm 7,1\%$ vs $26,9\% \pm 7,0\%$ pour les ASEs non sensibles, valeur P: 0,002) (Fig. 4C).

Une comparaison avec les événements ayant subi une altération naturelle de leur profil d'épissage révèle que les ASEs altérés de façon permanente par le shTDP-43 sont aussi celles altérés par le temps ($96,2\% \pm 1,5\%$ des ASEs sensibles altérés ont aussi vu leur profil



	Nb d'ASEs sensibles altérées (RNPS1)	Taux d'unités sensibles altérées dont le profil d'épissage change naturellement au cours du temps
Clone 1	37	16/37
Clone 2	25	12/25
Clone 3	40	19/40
Clone 4	38	23/38

49,8 % ± 3,7 %



	Nb d'ASEs sensibles altérées (TDP-43)	Taux d'unités sensibles altérées dont le profil d'épissage change naturellement au cours du temps
Clone 1	33	33/33
Clone 2	50	47/50
Clone 3	34	33/34
Clone 4	31	29/31

96,2 % ± 1,5%

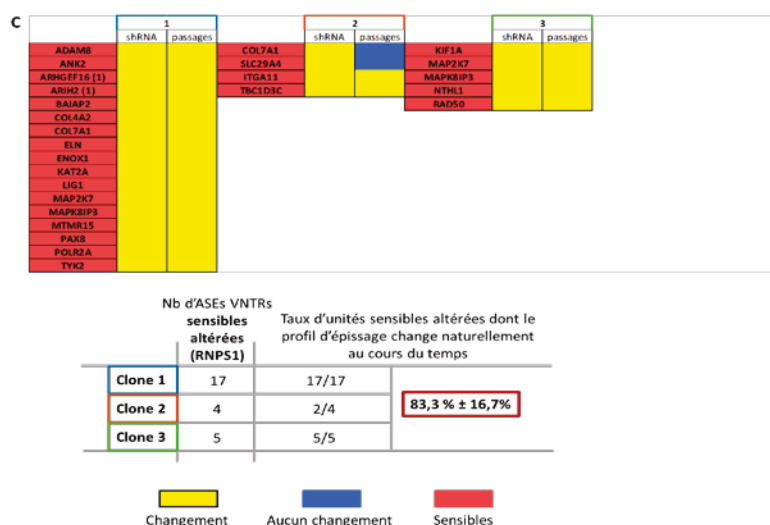


Figure 5 : La déplétion de RNPS1 accroît la fréquence d'altération permanente des profils d'épissage. Résultats de l'analyse RT-PCR (A) des ASEs sensibles de RNPS1 altérées par les vagues de déplétion, (B) des ASEs sensibles de TDP-43 altérées par les vagues de déplétion et (C) des ASEs sensibles altérés contenant des VNTRs par les vagues de déplétion suite à 42 jours (A et C) ou 48 jours (B) de croissance en culture où les HCT116 ont uniquement subi des passages cellulaires.

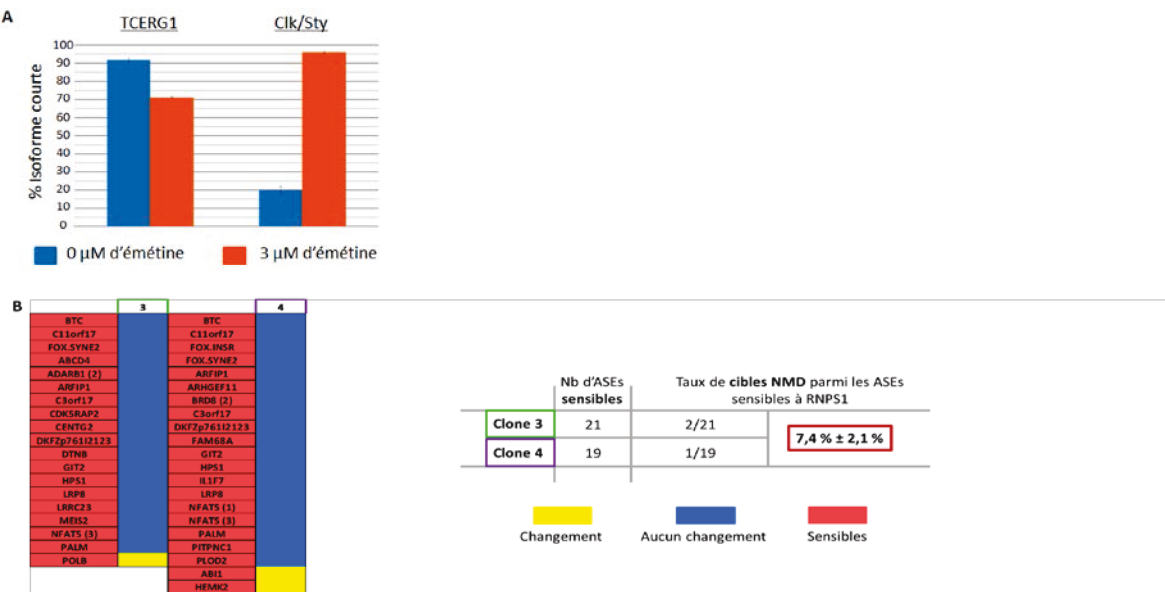
d'épissage modifié par le temps) (Fig. 5B). Cette situation est semblable à celle observée pour les ASEs comprenant VNTRs qui réagissent de façon stable à la déplétion de RNPS1 ($83,3\% \pm 16,7\%$) (Fig. 5C). Pour les événements classiques sensibles à RNPS1, la moitié des ASEs altérés de façon stable par la déplétion de RNPS1 sont altérés naturellement par le temps (Fig. 5A). Donc, contrairement à la protéine RNPS1, la déplétion de TDP-43 n'a pas significativement accentué le niveau d'altération des profils d'épissage des ASEs sensibles.

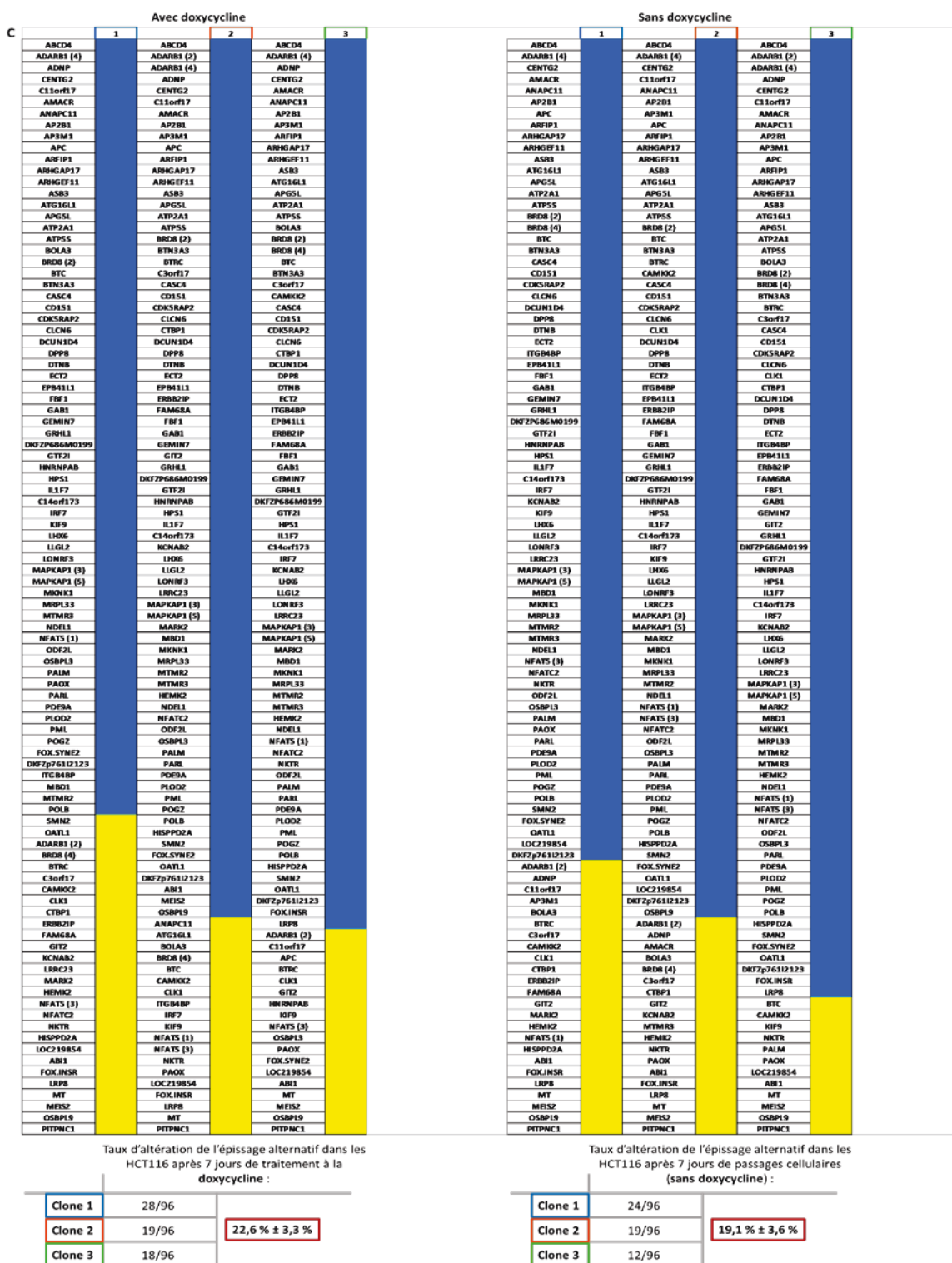
L'inactivation du NMD n'a pas d'impact significatif sur la régulation de l'épissage alternatif des événements sensibles

RNPS1, en plus d'être impliqué dans la régulation du processus d'épissage constitutif et alternatif, est une protéine auxiliaire du complexe EJC. En raison de ce fait, RNPS1 participe donc dans le processus de dégradation des ARNm qu'est le NMD. Suite à la réaction d'épissage, le complexe EJC dont RNPS1 fait partie, est déposé 20-24 nt en amont des jonctions exons-exons (Le Hir et al. 2000). Lors de la première ronde de traduction, le ribosome enlève de l'ARNm les complexes EJC qui y ont été déposés jusqu'à ce qu'il atteigne le codon de terminaison, normalement situé en aval du dernier complexe EJC. Or,

si l'ARNm mature a incorporé un PTC, et par conséquent en amont des derniers complexes EJC, cela va entraîner lors de la première ronde de traduction sa reconnaissance par les protéines effectrices du NMD et la dégradation subséquente de l'ARNm (Maquat 2004). Donc, dans une situation normale, l'isoforme incorporant le PTC ne sera que peu détectée. Or, la déplétion de RNPS1 peut entraîner l'inactivation de la voie du NMD et par conséquent la détection de l'isoforme normalement dégradée, affectant ainsi le ratio d'épissage. Une cible NMD peut faussement passer pour un authentique ASE sensible de RNPS1 (au niveau de la régulation de l'épissage). Comme le NMD se déroule avec un ARNm mature, et donc n'est pas un processus cotranscriptionnel, celui-ci n'a pas d'influence sur l'altération permanente des profils d'épissage. Cependant, celui-ci peut fausser la classification des ASEs et ainsi fausser la spécificité et l'exactitude des résultats précédents.

La proportion des ASEs sensibles dont l'inhibition du NMD produit la même polarité de changement de profil d'épissage que la déplétion transitoire de RNPS1 doit donc être déterminée. Pour se faire, avec 2 clones HCT116 snRNPS1 et 96 des 192 ASEs classiques, le NMD est inactivé avec l'utilisation d'émétine, un inhibiteur de la traduction. Les cellules sont traitées pendant 3 heures avec 3 μ M d'émétine, une concentration déterminée expérimentalement comme suffisante pour l'inhibition du NMD, tel que perçu par l'accroissement de la stabilité des isoformes contenant un PTC chez TCERG1 (isoforme longue) et Clk/Sty (isoforme courte) (Fig. 6A). Une cible NMD est définie comme un





cassettes) où les cellules HCT116 pTER vide ont été traitées sans ou avec 1,5 µg/mL de doxycycline (7 jours).

événement d'épissage dont la polarité de changement au niveau de son profil d'épissage induit par l'inhibition du NMD est équivalent à celui induit par la déplétion de RNPS1 dans les deux clones HCT116 shRNPS1 testés. Après détermination des cibles NMD, on constate que parmi les ASEs sensibles, la proportion de cibles NMD est faible ($7,4\% \pm 2,1\%$), voire si peu importante qu'elle n'a pu affecter de manière significative nos résultats et les conclusions qui en découle (Fig. 6B).

La doxycycline n'a pas d'impact significatif sur la régulation des profils d'épissage cibles

Un traitement à la doxycycline, un dérivé de la tétracycline, peut induire l'apoptose chez les cellules HCT116 de manière dépendante du facteur p53 via l'activation du facteur de transcription NF-κB des suites de la formation de superoxydes (formation qui découle du blocage de la synthèse de complexes enzymatiques de la chaîne mitochondriale de transport des électrons) (Fujioka et al. 2004). L'apoptose cellulaire pouvant altérer la régulation d'événements d'épissage alternatif, il se pourrait que l'effet perçu précédemment ne soit pas dû à l'emploi du shRNA, mais plutôt à l'emploi de la drogue même. Bien que la concentration de doxycycline employée pour induire l'expression du shRNA soit inférieure à celle qui est minimale pour l'activation de l'apoptose (1,5 µg par mL de milieu de culture vs 20 µg/mL)(Fujioka et al. 2004; Son et al. 2009), l'impact du traitement seul de la doxycycline par l'emploi du vecteur d'expression vide (pTER) sur la régulation de l'épissage alternatif de 96 unités fut vérifié. En comparant les résultats obtenus après 7 jours de croissance avec ou sans traitement à la doxycycline, on peut constater que le traitement à la doxycycline n'a affecté que légèrement plus la régulation des profils d'épissage, de manière peu significative, comparativement à la situation observée dans le cas des cellules ayant crues sans doxycycline ($22,6\% \pm 3,3\%$ VS $19,1\% \pm 3,6\%$, valeur P: 0,259) (Fig. 6C). Ainsi, l'impact de la doxycycline indépendamment de l'induction du shRNA est minime et ne devrait pas contribuer à nos résultats de façon importante.

L'altération permanente de la régulation des profils d'épissage d'ADARB1 découle de la présence de mutations

Deux mécanismes peuvent expliquer l'origine de l'augmentation des altérations permanentes des profils d'épissage par la déplétion de RNPS1. Premièrement, il pourrait y avoir eu une dérégulation de l'expression de facteurs d'épissage impliqués dans la régulation de ces événements (mécanisme trans). La deuxième possibilité est qu'en accord avec notre hypothèse de départ, des mutations seraient apparues dans les régions régulatrices importantes de l'allèle altéré (mécanisme cis). Une façon de distinguer entre ces deux mécanismes est d'effectuer des transfections croisées avec des minigènes (*swap allele assay*) (Fig. 7A). Ces minigènes contiennent nos ASEs isolés du génome de cellules t0 originales et celles ayant subi les multiples rondes de déplétions (t42). Les constructions t42 sont transfectées dans des cellules fraîches t0 n'ayant subi aucune altération, alors que celles conçues à partir de l'ADN génomique des cellules t0 originales le sont dans les cellules t42. Ainsi, dépendamment du mécanisme responsable de l'altération des profils d'épissage, les résultats seront diamétralement différents. Si la source de l'altération des profils d'épissage est bel et bien causée par des mutations des ASEs cibles (mécanisme cis), l'altération des profils d'épissage sera transposée dans les cellules t0 et perdue dans les cellules t42. L'opposé se déroulera s'il s'agit d'une altération de la concentration ou de l'activité des RBPs puisque la source est propre aux cellules (mécanisme trans).

Un premier essai dans le cadre des transfections croisées fut effectué avec l'unité d'épissage ADARB1. La régulation de l'épissage alternatif de l'exon cassette 9 d'ADARB1 est sensible à une déplétion transitoire de 7 jours de RNPS1 et son profil d'épissage a changé de façon permanente suite à trois vagues de déplétion (la croissance sans intervention n'avait pas entraîné de changement au niveau de la régulation de l'épissage alternatif de cette unité). Dans les transfections croisées, la transplantabilité de l'effet perçu (gène t42 dans les cellules t0) soutient le mécanisme *cis* plutôt que *trans* (Fig. 7B). Cet effet *cis* a aussi été observé pour la transfection croisée des gènes t0 et t42 de PPIL2, ABCD4 et IL28RA dans les cellules t0 (Fig. 7C).

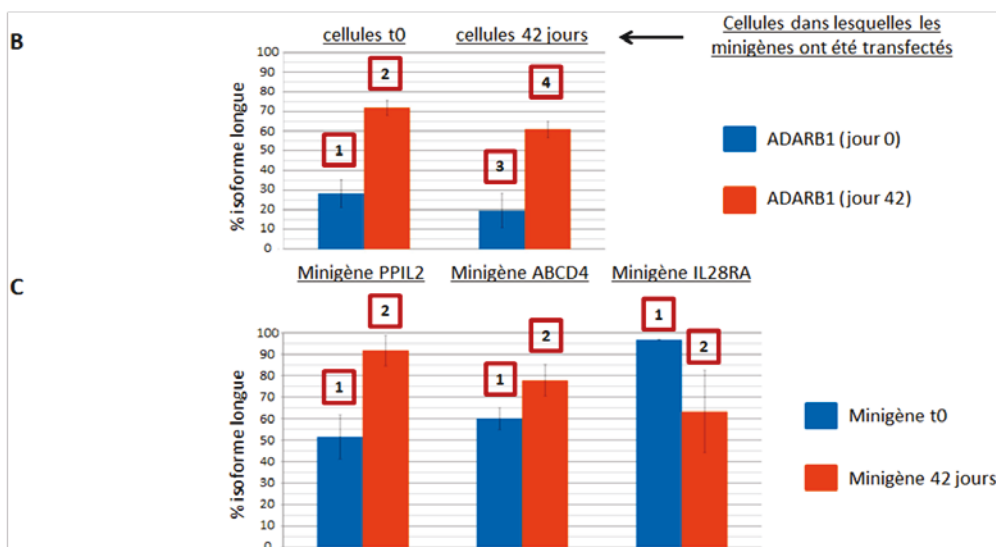
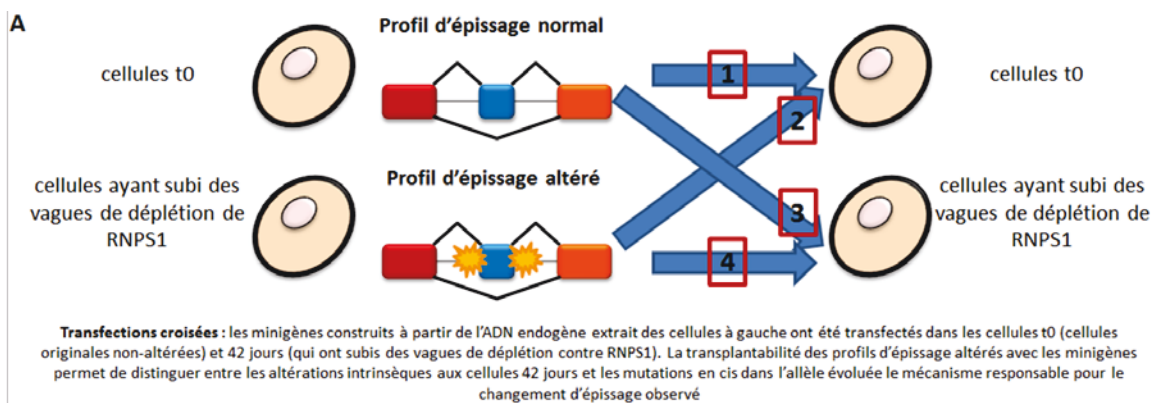
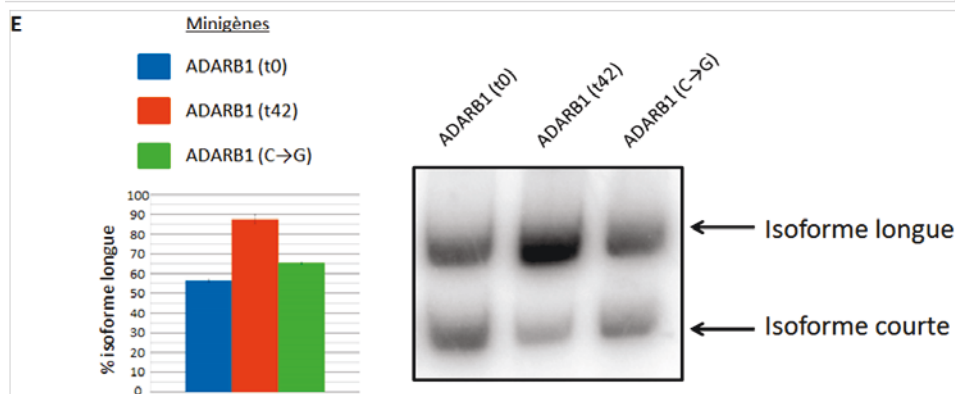
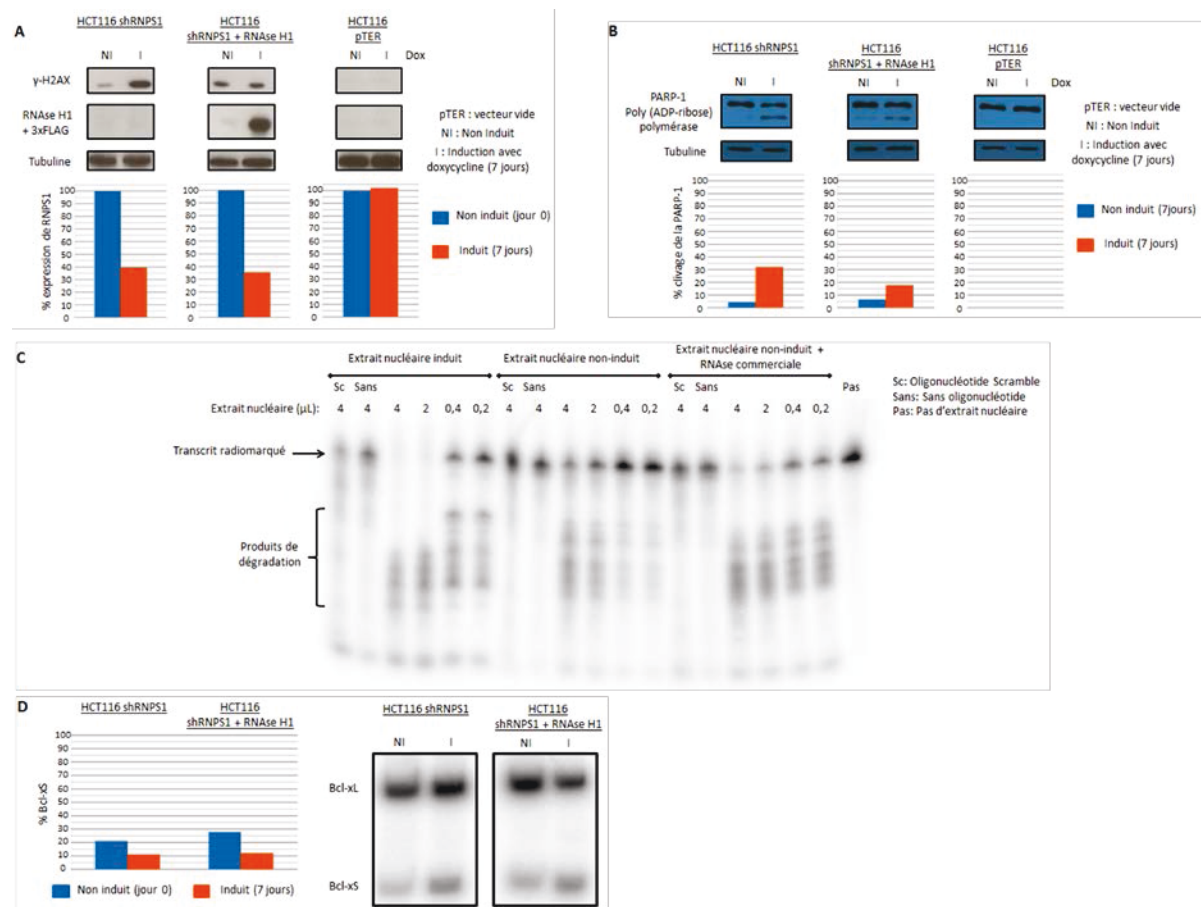
[illegible]

Figure 7: La déplétion de RNPS1 est associée à des mutations qui ont un impact sur la régulation de l'épissage alternatif. (A) Schéma expérimental de l'essai de transfections croisées. Les minigènes sont construits à partir de l'ADN génomique extrait de cellules HCT116 t0 et de cellules de 42 jours ayant été traitées avec le shRNA RNPS1. (B) Essais de RT-PCR sur l'ARN total extrait de cellules HCT116 transfectées avec les minigènes ADARB1 (t0) et ADARB1 (t42) (C) Essais de RT-PCR sur l'ARN total extrait de cellules HCT116 transfectées avec les minigènes t0 et 42 jours des unités PPIL2, ABCD4 et IL28RA (D) Séquence D'ADARB1 après plusieurs vagues de déplétion contre RNPS1 (42 jours) (E) Essais de RT-PCR sur l'ARN total extrait de cellules HCT 116 transfectées avec les minigènes ADARB1 (t0), ADARB1 (t42) et ADARB1 (C→G).

Le séquençage des minigènes d'ADARB1 (t0 et t42) a permis de révéler quelques mutations qui pourraient expliquer l'impact sur l'épissage alternatif (Fig. 7D). Afin d'examiner la contribution de ces mutations dans l'altération du profil d'épissage observé, nous avons corrigé la mutation située à proximité du site d'épissage 3' de l'exon cassette 9 d'ADARB1 dans notre copie du gène provenant de l'échantillon t42 (nt encadré dans Fig. 7D). Cette correction a ramené le profil d'épissage d'ADARB1 à un niveau similaire au gène de l'échantillon t0, confirmant ainsi l'implication de mutations comme causes de l'altération perçue (Fig. 7E).

Puisque l'instabilité génomique (mutations) résulte de la formation de cassures double brins de l'ADN, la déplétion de RNPS1 devrait accentuer la présence de marqueurs de dommages à l'ADN tels que la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX (Rogakou et al. 1998). La phosphorylation d'H2AX, qui survient suite à un dommage à l'ADN, est induite par une série de kinases telles que ATM et ATR et constitue l'une des premières étapes critiques de la détection de dommages (DDR) qui va entraîner le recrutement subséquemment de la machinerie de réparation de l'ADN au site du dommage. Après 7 jours d'induction du shRNA contre RNPS1, on voit un accroissement net de la phosphorylation de H2AX par rapport au contrôle t0 et à celui où uniquement des passages cellulaires ont été appliqués (Fig. 8A). Cet effet ne peut pas être dû à l'action de la doxycycline elle-même, car un traitement à la doxycycline, pendant la même période de temps, avec les cellules exprimant le plasmide vide (pTER) ne montre aucune stimulation de γ -H2AX (Fig. 8A). Ce résultat rejoint celui obtenu avec la déplétion d'autres facteurs d'épissage tels que SRSF1 (Li and Manley 2005). Ainsi, la déplétion d'un facteur d'épissage, au travers d'un accroissement de la formation de dommages à l'ADN, entraîne la production de mutations qui altèrent de manière permanente la régulation d'ASEs.

Afin d'évaluer la contribution des R-loops à l'instabilité génomique provoquée par la déplétion de RNPS1, nous avons testé l'effet de surexprimer la RNase H1, la nucléase qui a pour substrat la portion ARN des hybrides ARN-ADN, grâce à un système inductible à la doxycycline (Cerritelli and Crouch 2009). Cette surexpression devrait entraîner la destruction de la structure hybride, permettant ainsi au brin d'ADN non-transcrit de s'hybrider à nouveau avec son brin d'ADN complémentaire. Cela devrait permettre à la machinerie transcriptionnelle de poursuivre l'élongation et ainsi d'éviter une collision et un déassemblage néfaste de la fourche répliquative. Nous avons produit une lignée surexprimant la RNase H1 couplée à une étiquette 3X FLAG. Nous avons vérifié son activité *in vitro* à l'aide d'un substrat ADN-ARN synthétique et d'extraits nucléaires provenant de cellules induites (Fig. 8C). La surexpression pendant 7 jours de la RNase H1 abolit l'amplification de la phosphorylation d'H2AX induite par la déplétion de RNPS1, autre signe d'une RNase H1 active, mais aussi un premier indice préliminaire que les dommages perçus suite



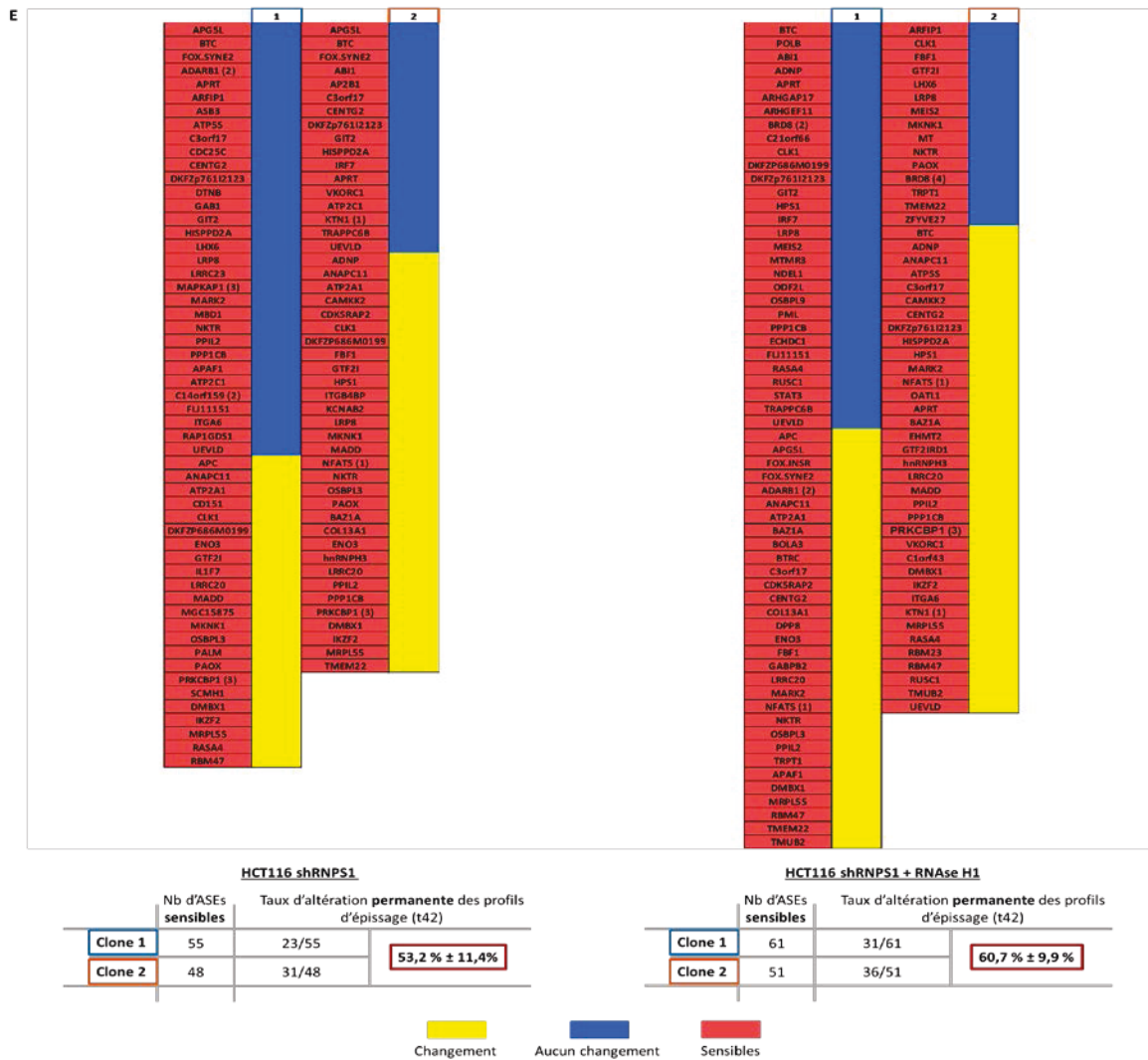


Figure 8 : La surexpression de la RNase H1 réduit la production de dommages à l'ADN induit par la déplétion de RNPS1. (A) Niveau de phosphorylation de l'histone H2AX détecté par immunobuvardage de type Western (utilisant α - γ -H2AX, α -FLAG et α -tubuline) dans des cellules HCT116 induites (7 jours). Niveau d'expression par RT-qPCR (normalisé avec contrôle interne) de l'ARNm de RNPS1 dans des cellules HCT116 shRNPS1 induites (7 jours). (B) Coupure de la PARP-1 détecté par immunobuvardage de type Western (utilisant α -PARP-1 et α -tubuline) dans des cellules HCT116 shRNPS1 induites (7 jours) (C) Essais de coupure *in vitro* par la RNase H1 3X FLAG d'un substrat ADN-ARN radiomarqué. La portion ARN radiomarquée est un transcrit de 130 nt synthétisé à partir de la région centrale répressive de SB1. Un oligonucléotide d'ADN de 20 nt complémentaire au transcrit a été ajouté afin de créer le substrat de la RNase H1. Les extraits nucléaires ont été produits à partir de cellules HCT116 shRNPS1 + RNase H1 3X FLAG qui ont été traitées avec (extrait nucléaire induit) ou pas (extrait nucléaire non induit) de doxycycline (1,5 μ g/mL) (D) Essais de RT-PCR pour l'unité Bcl-x sur l'ARN total extrait de cellules HCT116 shRNPS1 et HCT116 shRNPS1 + RNase H1 induites (7 jours) (E) Résultats de l'analyse par la plateforme de RT-PCR de l'Université de Sherbrooke des ASEs sensibles de RNPS1 où les HCT116 ont subi trois vagues de déplétion sans ou en combinaison avec la surexpression de la RNase H1.

à la déplétion de RNPS1 seraient possiblement dus à la formation *in vivo* de R-loops (Fig. 8A). Ce résultat est similaire à ceux observés par rapport à la réduction par la surexpression de la RNase H1 de la phosphorylation de l'histone induite par la déplétion de facteurs d'épissage (Li and Manley 2005). Aussi, la surexpression de la RNase H1 réduit la coupure de la PARP-1 induite par la déplétion de RNPS1. PARP-1, cible de la caspase effectrice 3, est impliquée dans la voie de la DDR et son clivage est reconnu comme un marqueur de l'apoptose cellulaire (Fig. 8B). Cette activation de l'apoptose cellulaire promue par la déplétion du facteur d'épissage pourrait possiblement découler de l'induction d'instabilité génomique. Aussi, la surexpression de la RNase H1 n'altère pas l'action régulatrice de RNPS1 au niveau de l'épissage alternatif puisque sa déplétion est toujours en mesure d'affecter la régulation de ses cibles telles que Bcl-x (Fig. 8D).

Nous avons aussi voulu vérifier l'aspect préventif de la surexpression de la RNase H1 sur l'altération permanente des profils d'épissage des ASEs sensibles. Dans les deux clones cellulaires testés, le traitement n'a pas été suffisant pour diminuer l'altération permanente des profils d'épissage de ces ASEs ($53,2 \% \pm 16,1 \%$ sans la surexpression de la RNase H1 vs $60,7 \% \pm 16,1 \%$ avec la surexpression de l'enzyme, valeur P: 0,334) (Fig. 8E). Deux possibilités peuvent expliquer ce résultat négatif avec la surexpression de la RNase H1. Premièrement, la formation du R-loop n'est pas impliquée dans l'altération de l'épissage perçue par la déplétion du facteur d'épissage. Un mécanisme alternatif pourrait donc être à l'origine de ces changements permanents dans l'épissage alternatif des unités sensibles. L'autre possibilité est que la formation de R-loops est impliquée dans l'altération du profil d'épissage des unités sensibles, mais que la méthode employée, à savoir la surexpression de la RNase H1, n'est pas appropriée pour en déceler l'apport. En effet, la RNase H1 n'empêche pas la formation de la structure hybride, mais plutôt dissout celle-ci une fois créée. En agissant ainsi en aval du problème, la surexpression de la RNase H1 n'est peut-être pas en mesure d'empêcher totalement la génération de dommages à l'ADN. En ralentissant la vitesse de transcription, et de l'allongement des R-loops, de l'ARN pol II par l'emploi d' α -amanitin (inhibiteur de la translocation de l'ARN et de l'ADN au site actif de la polymérase pour la prochaine ronde de synthèse de l'ARN), la RNase H1 pourrait possiblement être en mesure d'intervenir plus efficacement au niveau de la prévention de la formation de dommages à l'ADN. Un autre moyen de soutenir un rôle des R-loops dans

l'altération permanente du profil d'épissage serait d'accentuer l'impact mutationnel de ces structures par l'emploi de déaminases telles qu'AID qui ont la propriété de muter la portion ADN non-appariée souvent riche en GC des R-loops (Muramatsu et al. 1999; Muramatsu et al. 2000; Petersen-Mahrt et al. 2002; Bransteitter et al. 2003; Pham et al. 2003).

DISCUSSION

SRSF10, 14-3-3ε, hnRNP A1/A2 et Sam68 sont au cœur de la convergence des voies de stress dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x

L'élément SB1 est une région de 361 nt correspondant à la première moitié du deuxième exon de Bcl-x. Ce grand élément, situé près de 145 nt en amont du site d'épissage xS, agit globalement comme un répresseur de l'utilisation du site pro-apoptotique (Revil et al. 2007). Des travaux antérieurs effectués dans le laboratoire ont démontré que cette région constitue un point de convergence des voies de signalisation de la protéine kinase C ou PKC et de la voie de réponse aux dommages à l'ADN ou DDR (Revil et al. 2007; Shkreta et al. 2011; Shkreta et al. 2016). L'activation de la DDR par un traitement à l'oxaliplatine ou l'inactivation de PKC par l'utilisation de l'inhibiteur général de kinase stauroporine ou d'inhibiteurs spécifiques de la kinase entraînent toutes les deux un accroissement de la production de l'isoforme Bcl-xS dans les cellules ECR-293 (Revil et al. 2007; Shkreta et al. 2008; Shkreta et al. 2011).

PKC est en fait une grande famille de kinases encodées par une douzaine de gènes (certaines ayant plus d'une isoforme) et réparties en trois classes selon le second messenger requis, soit les PKC conventionnelles/classiques, nouvelles/non classiques ou atypiques (Mellor and Parker 1998). L'expression au sein des différents types cellulaires, ainsi que leur sensibilité aux inhibiteurs, varient d'une isoforme à l'autre (Langzam et al. 2001; Varga et al. 2004; Aaltonen et al. 2006). Au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré la participation des différentes isoformes de PKC dans la régulation parfois indépendante de SB1 de l'épissage alternatif de Bcl-x. Dans les cellules U251 (glioblastome humain) la région couvrant les 76 nt introniques immédiatement en aval du site d'épissage xL médie l'impact anti-apoptotique du 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA), impact qui est abolit par l'utilisation du flavonoïde erigeron breviscapus, un inhibiteur de la kinase PKC (Zhu et al. 1999; Li et al. 2004). Dans les cellules A549, la protéine kinase C atypique PKC ι (iota) défavorise la sélection du site apoptotique au travers

d'un accroissement de l'expression de SF3B1 et par conséquent, d'une augmentation de la formation du complexe SF3B1-CRCE1 (Shultz et al. 2012). Dans ces cellules cancéreuses, l'emploi d'inhibiteurs couvrant uniquement les autres classes de PKC (classiques et non classiques) et excluant PKC ι n'a qu'un impact peu significatif sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x, une situation différente de celle qui prévaut dans les cellules transformées non malignes ECR-293 (Revil et al. 2007; Shultz et al. 2012). Dans ces dernières cellules, l'emploi de l'inhibiteur Gö6976 (inhibe les isoformes PKC α , PKC β , et PKC μ /PKD) reproduit l'effet pro-apoptotique de la staurosporine sur la régulation de l'épissage de Bcl-x. L'utilisation de techniques plus sélectives (ARNi, inhibiteur au rayon plus restreint) n'a cependant pas permis de déterminer avec précision l'isoforme de PKC jouant un rôle dans cette régulation de l'épissage alternatif (Revil et al. 2007). Une autre isoforme de la kinase PKC est impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. En effet, la déplétion par ARNi de l'isoforme PKC δ II (homologue murin de la PKC δ VIII humaine) dans les cellules HT22 (cellules murines de l'hippocampe immortalisées) abolit l'impact anti-apoptotique de l'insuline (impact confirmé *in vivo* au niveau de l'hippocampe murin suite à l'injection intranasale de l'insuline). Cette production accrue de l'isoforme Bcl-xL par l'insuline découle de sa modulation par la voie PI3K de l'épissage alternatif de PKC δ en faveur de l'isoforme PKC δ II (Apostolatos et al. 2012). Il est connu que la céramide pro-apoptotique a un impact sur l'activité des différences isoformes de PKC. Alors que la céramide inactive la PKC α classique (via une déphosphorylation modulée par une phosphatase de protéine) et la PKC ϵ non classique (compétition avec ses substrats), celle-ci active la PKC δ non classique par l'action d'une kinase de tyrosines (Lee et al. 1996; Bourbon et al. 2001; Kajimoto et al. 2001)

Du côté de l'oxaliplatine, l'action pro-apoptotique découlerait de la déphosphorylation de résidus tyrosines d'un facteur d'épissage suite à l'activation de l'axe ATM/CHK2 puisque l'utilisation de l'inhibiteur de tyrosines phosphatases orthovanadate en abolit l'impact (Shkreta et al. 2011). Récemment, notre laboratoire a découvert que SRSF10 participe à la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x et module l'action pro-apoptotique de l'oxaliplatine. L'utilisation d'ARNi contre les protéines hnRNP K, F et H abolit l'impact pro-apoptotique de la surexpression de SRSF10 qui nécessite la présence des régions B1U

et B2G. Dans des conditions de croissances normales, la déplétion de SRSF10 par l'utilisation d'ARNi n'a que peu d'impact sur la régulation de l'épissage de Bcl-x. Ainsi, dans ces conditions, sur une quantité minimale de transcrits de Bcl-x, SRSF10 s'associe à hnRNP K, F et H, entravant la répression du site xS par la première protéine et stimulant le recrutement pro-apoptotique des deux dernières. Lorsque les cellules sont traitées à l'oxaliplatine, la déphosphorylation des sérines 131 et 133 situées dans le domaine RS1 de SRSF10 entraîne la dissociation de l'interaction entre les protéines SRSF10, hnRNP F et H, bien que l'interaction entre SRSF10 et hnRNP K soit maintenue. Par conséquent, une SRSF10 déphosphorylée prévient le recrutement d'hnRNP K (la liaison au pré-ARNm de Bcl-x est d'ailleurs compromise par la déphosphorylation médiée par la drogue de la sérine 216 d'hnRNP K), permet ainsi à hnRNP F et H de favoriser une production importante de l'isoforme pro-apoptotique (Shkreta et al. 2016).

L'entrave via l'inactivation de p53 ou l'utilisation de l'inhibiteur orthovanadate à l'utilisation accrue du site xS par la staurosporine soutient une convergence entre les voies de signalisation de la DDR et de PKC. Ainsi, au cœur de cette convergence se trouverait la régulation de la phosphorylation de résidus d'un ou des facteurs trans protéiques communs d'identité inconnue dans les cellules ECR-293 (Shkreta et al. 2011). Dans l'optique d'une meilleure caractérisation des sous-régions de cet élément pouvant être importantes pour la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x et potentiellement pour l'impact de ces deux voies, nous avons effectué une mutagenèse couvrant 10 nt à la fois les 310 derniers nt de cette région pour lesquels un impact sur la régulation de l'épissage avait été découvert dans des essais préliminaires (Revil et al. 2007). Cette mutagenèse exhaustive a démontré que le grand élément SB1 est composé de plusieurs régions régulatrices en cis qui ont des effets diamétralement opposés sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. Tout d'abord, quatre petites sous-régions régulatrices isolées, deux répressives (Reg 2 et 23) et deux activatrices (Reg 28 et 30), sont disséminées à la grandeur de l'élément. L'une d'entre elles (Reg23) contient un site de pause pour l'ARN pol II favorable à la répression de la sélection du site d'épissage xS. La surexpression du facteur de transcription TCERG1 dissipe l'accumulation de la polymérase à ce site de pause, permettant un accroissement de l'utilisation du site xS (Montes et al. 2012; Montes et al. 2015). Le facteur TCERG1

pourrait constituer l'un des effecteurs mystérieux par lesquels la staurosporine et l'oxaliplatine régulent l'épissage alternatif de Bcl-x puisque sa déplétion par shRNAs dans les cellules HEK293T et Jurkat T (lymphocytes T immortalisés) réduit l'accroissement de la production de l'isoforme apoptotique promu par ces drogues (Montes et al. 2015). Finalement, l'activité globale répressive de SB1 est principalement concentrée au niveau d'une région centrale répressive de 110 nt (Reg9-19) interrompue par un court activateur (Reg12). Cette région centrale répressive, qui comprend entre autres la sous-région responsable de l'action répressive de RNPS1 (Reg18) (Michelle et al. 2012), correspond à la région chevauchante de deux fragments de SB1 sensibles à la staurosporine identifiés précédemment (Revil et al. 2007). La réinsertion de cette région centrale répressive dans le minigène Δ SB1 réintroduit la répression de l'utilisation du site xS perdue par la délétion de l'élément et amène une réponse partielle à un traitement à la staurosporine. Cette transposabilité indique qu'un ou plusieurs facteurs trans liés à Reg9-19 contribuent à l'altération de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x médiée par la staurosporine.

Avec ces informations issues des essais de mutagenèse, nous avons employé deux approches différentes de chromatographie d'affinité d'ARN dans le but de récupérer et identifier les facteurs protéiques trans liant ces sous-régions régulatrices en cis et donc possiblement effecteurs des voies de la PKC et de la DDR. Plusieurs facteurs d'épissage connus pour être impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x sont des cibles connues de la PKC: SRSF1 (Colwill et al. 1996), SRSF2 (PKC- θ) (McCuaig et al. 2015) et hnRNP K (PKC δ) (Schullery et al. 1999). Par rapport à l'activation de la DDR, l'utilisation de cisplatine, un autre composé à cœur de platine au mécanisme d'action similaire à l'oxaliplatine, accroît l'activité des facteurs d'épissage SRSF1 et 2 dans des lignées cancéreuses mammaires et utérines pour la première et cancéreuses pulmonaires pour la seconde (Edmond et al. 2011; Comiskey et al. 2015). Il est peu probable que la stimulation de l'activité de SRSF1 soit à l'origine du changement de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x exercé par l'oxaliplatine puisque d'une part cette stimulation est indépendante d'ATM et d'autre part SRSF1 est un répresseur de l'isoforme Bcl-xS dans les cellules non transformées 293 (Paronetto et al. 2007; Cloutier et al. 2008; Comiskey et al. 2015). L'utilisation de caféine, un inhibiteur des kinases ATM/ATR, réduit l'expression

d'un stimulateur de l'utilisation du site xS, à savoir SRSF3 (Lu et al. 2014). La première méthode consistait en la transfection dans les cellules ECR-293 de minigène comprenant soit un SB1 complet ou triplement mutés (Reg2, 17 et 23) tous deux couplés à une étiquette composée de 10 répétitions du site de liaison de la protéine MS2. Par la technique de purification TAP (*tandem-affinity purification*), nous avons pu isoler la protéine 14-3-3 ϵ , l'un des sept membres de la famille de chaperonnes 14-3-3 (van Hemert et al. 2001). Il était connu que 14-3-3 ϵ et ζ interagissent avec le facteur d'épissage SRSF10, prévenant ainsi sa déphosphorylation par PP1 (Shi and Manley 2007). Cette association protectrice est perdue dans le cas d'un choc thermique ou d'une exposition au rayonnement UV (Shi and Manley 2007; Blasius et al. 2014).

Aucune contribution de 14-3-3 ϵ ou d'un autre membre de cette famille de chaperonnes à la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x n'avait été découverte précédemment. Plusieurs études avaient cependant révélé un rôle pour plusieurs membres de cette famille de chaperonnes comme régulateur du processus d'épissage alternatif de nombreux événements. En effet, la surexpression de 14-3-3 ζ chez la souris réduit l'épissage de Xbp1 (Brennan et al. 2013). La liaison de 14-3-3 β à la kinase de protéines SR SRPK2 empêche son clivage par la caspase effectrice 3 suite à l'activation de l'apoptose (Hong et al. 2011). La liaison 14-3-3 ζ à une protéine Ataxin-1 phosphorylée interfère avec son interaction avec le facteur d'épissage U2AF65, réduisant sa stimulation de l'utilisation du site d'épissage 3' proximal dans un minigène rapporteur (de Chiara et al. 2009). La phosphorylation d'une sérine située au sein du motif de liaison à l'ARN KH de la protéine hnRNP KSRP entraîne son association avec la protéine 14-3-3 ζ et sa rétention au noyau (Diaz-Moreno et al. 2009).

Au niveau de la deuxième approche de chromatographie d'affinité d'ARN, un essai utilisant la région centrale répressive (Reg8 à 20) et des extraits nucléaires issus de cellules HeLa a permis de repêcher les protéines hnRNP A1 et A2/B1. En examinant la séquence de cette région de 130 nt employée, on constate la présence de quatre sites potentiels de la liaison pour ces protéines (UAGGGA/U) répartis de la sous-région répressive 14 à 18, supportant ainsi l'implication potentielle de celles-ci dans la régulation de l'épissage de Bcl-x (Burd and Dreyfuss 1994). hnRNP A1 peut interagir avec une Sam68

déphosphorylée au niveau de résidus tyrosines, un régulateur de l'épissage alternatif de Bcl-x dans certaines conditions (Paronetto et al. 2007). Sam68 (*Src associated in mitosis of 68 kDa*), ou KHDRBS1 (*KH domain-containing RNA-binding signal transduction associated protein 1*), est un membre de la famille STAR (*signal transduction and activation of RNA*). La séquence de liaison à l'ARN pour la protéine Sam68 fut déterminée par SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) comme étant riche en uraciles et adénosines, avec une très forte affinité pour les fragments contenant le motif UAAA (Lin et al. 1997). Ce motif est présent au sein du premier tiers de l'élément SB1, tout juste en amont de la région centrale répressive et donc absente de la cible employée dans cet essai de chromatographie d'affinité.

Alors que la surexpression de la protéine 14-3-3 ϵ accroît la production de l'isoforme Bcl-xS, sa déplétion par ARNi, comme c'est le cas pour SRSF10, ou son inactivation fonctionnelle par l'emploi de difopein (empêche la liaison de 14-3-3 à ses ligands) n'a que peu d'impact sur la régulation de l'épissage de Bcl-x. Cependant, comme SRSF10, la déplétion de la protéine réduit l'impact pro-apoptotique de l'activation de la DDR par un traitement à l'oxaliplatine. La déplétion de 14-3-3 ϵ annule l'impact de la surexpression de la protéine SR sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. Ainsi, 14-3-3 ϵ est, à l'instar des protéines hnRNP K, F et H, important pour l'accroissement de la production de l'isoforme Bcl-xS médié par la protéine SRSF10 des suites d'un traitement à l'oxaliplatine. Le traitement à l'oxaliplatine pourrait altérer l'expression, la localisation et l'activité de la protéine 14-3-3 ϵ . À titre d'exemple, le traitement d'une lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome œsophagien (TE7) avec l'oxaliplatine résulte en une réduction de l'expression de la protéine 14-3-3 σ (Ngan et al. 2008). Dans les cellules cancéreuses colorectales HCT116, l'induction de dommages à l'ADN par divers agents ou irradiation gamma accroît l'expression de 14-3-3 σ qui va s'associer et séquestrer la phosphatase cdc25c. Cette séquestration entraîne un arrêt du cycle cellulaire en empêchant l'entrée en phase mitotique (Hermeking et al. 1997).

Du côté des protéines Sam68, hnRNP A1 et A2, la réduction de l'expression de ces protéines par ARNi dans nos essais n'a pas affecté la régulation de l'épissage alternatif de

Bcl-x. Ces résultats rejoignent plusieurs observations des dernières années au sujet de l'impact de ces protéines dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. Ainsi, alors que la déplétion par ARNi de Sam68 n'a qu'un impact peu significatif, en deçà de notre seuil d'acceptation expérimental, sur l'utilisation des sites d'épissage de Bcl-x dans des cellules non cancéreuses HEK293, la surexpression de celle-ci entraîne une utilisation accrue du site d'épissage 5' xS (Paronetto et al. 2007). Dans la même étude, la réduction de l'expression d'hnRNP A1 n'a elle aussi que peu d'impact sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x (Paronetto et al. 2007), résultat en accord avec ceux obtenus dans le passé par notre équipe dans diverses lignées (Revil et al. 2009; Michelle et al. 2012). De même, des essais de chromatographies d'affinité d'ARN *in vitro* utilisant l'élément CRCE1 comme appât ont permis de récupérer Sam68, hnRNP B1 et hnRNP A1B. Encore une fois, la déplétion de ces protéines, en plus d'hnRNP A1, n'a pas donné de changement significatif à la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x dans les cellules A549 (Massiello et al. 2006). Cependant, nos travaux ont montré que la déplétion de ces trois protéines réduit non seulement, à l'instar des protéines SRSF10 et 14-3-3 ϵ , l'action pro-apoptotique de l'oxaliplatine, mais aussi celle de la staurosporine. Ainsi, l'impact de ces trois protéines (Sam68, hnRNP A1 et A2/B1) sur la régulation de l'épissage alternatif ne semble être significatif que dans certaines lignées cellulaires ou contextes qui ne semblent pas être présents dans conditions de croissance normale pour la lignée non transformée ECR293 utilisée dans nos expériences.

De plus, la capacité à hnRNP A1 de transiter entre le noyau et le cytoplasme permet à celle-ci de contrôler l'expression protéique de transcrits cibles au travers de fonctions extranucléaires (Pinol-Roma and Dreyfuss 1992). Ce cycle d'exportations et d'importations au noyau de la part d'hnRNP A1 dépend des modifications post-traductionnelles apportées à ses résidus, en particulier les sérines. La phosphorylation des sérines 4 et 6 d'hnRNP A1 par la kinase S6K2 (activée par FGF-2) permet d'une part l'association de celle-ci à ses transcrits cibles en vue de l'exportation du noyau et d'autre part, permet une fois arrivée au cytoplasme la dissociation de la protéine des transcrits et son association aux isoformes σ et θ de 14-3-3 en vue de la sumoylation d'une lysine (K183) et du retour subséquent de la protéine hnRNP A1 au noyau. Cette perte d'association entre la protéine hnRNP A1 et ses

transcrits au cytoplasme permet la traduction de ceux-ci médiée par le recrutement indépendamment de la coiffe d'un ribosome à un IRES (*internal ribosome entry site*). Bcl-xL est l'un de ses transcrits cibles liés par hnRNP A1 au niveau de la région 5'UTR de ceux-ci dont la traduction est stimulée FGF-2 via la voie de signalisation MEK/ERK (Pardo et al. 2002; Pardo et al. 2006; Roy et al. 2014). Ainsi, hnRNP A1 est impliquée dans l'exportation et l'éventuelle traduction de variants d'épissage de Bcl-x. Toute altération à ce cycle d'exportation /importation de la protéine engendre une diminution de l'expression protéique de Bcl-xL (Iervolino et al. 2002). En situation de stress tels qu'hypertoniques ou d'infection par le rhinovirus humain, l'accumulation résultante cytoplasmique d'hnRNP A1 amène une réduction de la traduction de l'isoforme longue Bcl-xL (Courteau et al. 2015). Cette accumulation cytoplasmique d'hnRNP A1 répressive de la traduction de Bcl-xL en situation de stress est contrôlée par l'action de kinases telles que MAPK11 de la voie p38-MAPK et l'hexokinase 2 (HK2) ou du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α phosphorylé (Allemand et al. 2005; Bevilacqua et al. 2010; Courteau et al. 2015). Cet impact des modifications post-traductionnelles sur l'activité d'hnRNP A1 pourrait expliquer pourquoi dans certains cas le niveau d'expression élevée de la protéine hnRNP A1 corrèle avec un niveau accru d'expression protéique de l'isoforme anti-apoptotique Bcl-xL, tel que dans des lignées de cancer du poumon à petites cellules (SCLC) (Pino et al. 2003), alors que la surexpression de celle-ci dans les cellules HEK293 réduit le niveau d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Roy et al. 2014).

Nous proposons que les protéines 14-3-3 ϵ , SRFS10, hnRNP A1/A2 et Sam68 agissent de manière combinatoire avec hnRNP F et H à la levée de la répression de l'utilisation du site d'épissage xS exercée par RNPS1, hnRNP K et d'autres possibles répresseurs (Fig. 17). En effet, en plus des interactions avec SRSF10 démontrés dans nos expériences, il était connu qu'hnRNP A1 interagit entre autres avec 14-3-3 ϵ et Sam68, mais aussi avec hnRNP H avec lequel nous avons démontré par le passé collaborait à la sélection de sites d'épissage (Paronetto et al. 2007; Fisette et al. 2010; Roy et al. 2014). Ce complexe anti-répresseur ne serait présent que sur une minorité de transcrits de Bcl-x en conditions normales de croissance, expliquant le peu d'impact de la déplétion de nos protéines cibles dans ces conditions. Nos résultats ont démontré que l'induction de stress par l'inactivation de la

PKC ou l'activation de la DDR entraîne au travers de la signalisation cellulaire et de modifications post-traductionnelles un remodelage dynamique des interactions protéiques

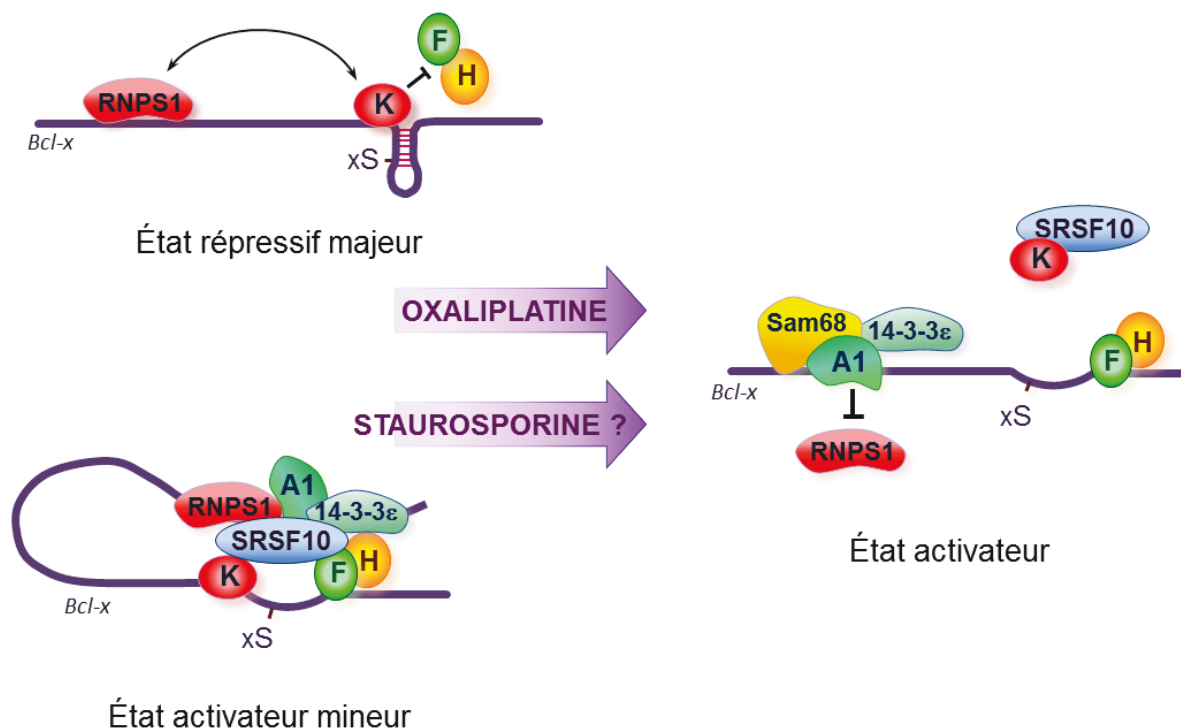


Figure 17. La régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x est remodelée par les dommages à l'ADN et l'inactivation de la PKC. Le complexe répressif est présent sur la majorité des transcrits en conditions normales de croissance dans les cellules 293 (en haut, gauche), alors le complexe activateur n'est présent que sur une minorité de transcrits (en bas, gauche). L'inactivation par la voie de la PKC par la staurosporine ou l'activation de la DDR par l'oxaliplatine entraîne un remodelage de la régulation qui favorise l'assemblage du complexe activateur (à droite). Pour simplifier, A1 est utilisé pour indiquer les protéines hnRNP A1/A2.

entre les RBPs repêchées et une reconfiguration de l'activité de celles-ci. À l'image de la situation qui prévaut avec hnRNP F et H, l'oxaliplatine abroge l'interaction entre SRSF10 et les protéines 14-3-3ε et hnRNP A1. Cette perte de l'association de SRSF10 suite à un traitement à l'oxaliplatine entraîne le départ combiné de la protéine et du facteur d'épissage associé répressif hnRNP K et l'arrivée des stimulateurs hnRNP F et H. Ce traitement a renforcé l'interaction au pré-ARNm de Bcl-x des protéines hnRNP F et H montrée précédemment, mais aussi des facteurs d'épissage hnRNP A1/A2 et Sam68 (Shkreta et al. 2016). Ce renforcement pourrait entraîner le départ de répresseurs présents au niveau de SB1 tel que RNPS1.

Du côté de la staurosporine, celle-ci pourrait agir au niveau des interactions mutuelles entre les protéines hnRNP A1/A2 et Sam68. La modulation de l'épissage alternatif de Bcl-x par la surexpression de Sam68 découlerait de la formation d'un complexe avec la protéine hnRNP A1 via association au domaine C-terminal de Sam68, plus précisément au niveau des 93 derniers résidus (résidus 351 à 443). En effet, la réduction par ARNi d'hnRNP A1 dans les cellules HEK293 atténue grandement la production de l'isoforme pro-apoptotique induite par la surexpression de Sam68 (Paronetto et al. 2007). La formation de ce complexe a été observée par la suite dans une autre lignée cellulaire, celle des cellules cancéreuses BxPC3 (adénocarcinome humain du pancréas avec haut potentiel métastatique) (Chen et al. 2011). Cette coopération entre Sam68 et hnRNP A1 dans la régulation de l'épissage alternatif a aussi été observée dans d'autres situations comme au niveau de l'exon 7 de SMN2. La liaison de Sam68 à un ESE situé à proximité du site d'épissage 3' de l'exon 7 permet le recrutement d'hnRNP A1 et tous deux peuvent ainsi interférer avec la reconnaissance de ce site par U2AF65 et l'inclusion de cet exon (Kashima and Manley 2003; Kashima et al. 2007; Pedrotti et al. 2010; Pagliarini et al. 2015). Dans certaines situations, cette relation est plutôt antagoniste. Alors qu'hnRNP A1 et A2 favorisent l'exclusion de l'exon 6 du virus du papillome humain de type 16 (HPV16), Sam68 au contraire promeut son inclusion (Rosenberger et al. 2010).

Cette coopération entre les deux protéines pourrait dépendre de la phosphorylation de certains résidus présents au sein de ces protéines. Tel que son nom le mentionne, Sam68 fut d'abord isolé et identifié dans les cellules murines NIH3T3 (fibroblastes) en phase mitotique comme substrat de la famille de kinases Src au travers d'une liaison aux domaines SH2 et SH3 (*src homology*) des enzymes, entraînant par conséquent une phosphorylation de résidus tyrosine de Sam68 (Fumagalli et al. 1994; Taylor and Shalloway 1994; Richard et al. 1995). Parmi les membres de cette famille, Fyn a été montré comme régulant l'activité de Sam68 au travers de la phosphorylation de résidus tyrosines. Cette phosphorylation par Fyn entraîne une diminution de l'affinité de la protéine pour des oligonucléotides d'ARN synthétiques *in vitro* (Wang et al. 1995), perte d'affinité reproduite *in vivo* par rapport à ces cibles telles Bcl-x (Paronetto et al. 2007; Chen et al. 2011). La distribution intracellulaire de la protéine s'en trouve remaniée, avec une Sam68

phosphorylée allant d'une distribution diffuse dans le nucléoplasme à une concentration dans des foyers sous-nucléaires et une rétention cytoplasmique (Lukong et al. 2005; Paronetto et al. 2007; Lukong et al. 2009). Ainsi, la phosphorylation de résidus tyrosines par Fyn entraîne la perte de l'interaction entre hnRNP A1 et Sam68 et donc la dissociation du complexe, entravant par le fait même la levée de la répression de l'utilisation du site xS du pré-ARNm de Bcl-x (Paronetto et al. 2007; Chen et al. 2011). L'abolition de la kinase par knock-out restaure une production accrue de l'isoforme apoptotique. Il est à noter que la staurosporine peut s'associer à Fyn et ainsi possiblement inhiber directement la kinase (Kinoshita et al. 2006). La staurosporine pourrait ainsi favoriser l'interaction entre ces deux protéines. De plus, la kinase Fyn est à la fois le substrat de plusieurs isoformes de PKC (Cabodi et al. 2000; Crosby and Poole 2003; Hsu et al. 2009; Asimaki and Mangoura 2011; Higa-Nakamine et al. 2015) et l'une des enzymes qui contrôle la phosphorylation de ses résidus tyrosines et son activité (Gschwendt et al. 1994; Denning et al. 1996; Ron et al. 1999; Kronfeld et al. 2000; Joseloff et al. 2002; Cannons et al. 2004). Ainsi, Fyn pourrait être l'un des chaînons manquants reliant Sam68-hnRNP A1 avec la voie de signalisation de PKC et son impact sur la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. La régulation de l'activité de Sam68 par la phosphorylation de certains de ses résidus est complexe et dépend de l'identité de ces acides aminés ciblés. Par exemple, la stimulation par les kinases ERK 1/2 de la voie MAP kinase de l'inclusion de l'exon cassette v5 contenu dans le pré-ARNm CD44 dépend de la phosphorylation des résidus Ser58, Thr71 et Thr84 de Sam68. Au contraire de la phosphorylation de résidus tyrosines par la kinase Fyn, le changement au profil d'épissage de CD44 stimulé par la phosphorylation des trois précédents acides aminés ne découle pas d'une altération de la capacité de Sam68 à lier l'ARN, mais plutôt d'une modification de ses interactions avec ses partenaires protéiques (Matter et al. 2002).

L'activité des kinases Src étant augmentée dans les cellules cancéreuses PCAs et BxPC3 (pour Fyn uniquement), et par conséquent la phosphorylation des résidus tyrosine de Sam68 (Paronetto et al. 2004; Chen et al. 2011), cela pourrait constituer une des raisons expliquant en partie l'effet anti-apoptotique de la protéine au sein des lignées malignes. La phosphorylation modulée par Fyn n'abroge pas totalement la capacité de Sam68 de s'associer à des partenaires protéiques, car l'interaction avec le facteur de transcription

FBI-1 n'est nullement affectée par l'action de la kinase (Bielli et al. 2014). Une couche supplémentaire de régulation de l'activité de Sam68 par Fyn existe via l'entremise de la régulation de l'épissage alternatif de ce dernier. En effet, deux isoformes majeures de la kinase Fyn sont produites à partir de la sélection, au niveau de l'exon 7, de deux exons mutuellement exclusifs, soit l'exon 7A (isoforme FynB) et l'exon 7B (isoforme FynT). Ces isoformes ont un patron d'expression variable d'un type cellulaire à l'autre (Cooke and Perlmutter 1989). Les isoformes ayant une affinité différente pour leurs substrats, la modulation de leur production va par conséquent affecter l'activité cellulaire de leurs cibles. Ainsi, FynT, ayant une plus forte association avec Sam68 que ne l'a FynB, phosphoryle la protéine cible et prévient, dans les cellules HEK293 et Jurkat T (lymphocytes T immortalisés), l'accroissement de l'utilisation du site 5' xS de Bcl-x induit par la surexpression de Sam68 (Brignatz et al. 2009).

La protéine kinase C pourrait aussi cibler directement nos protéines repêchées. En effet, hnRNP A1 est un substrat connu de la PKC, étant phosphorylé principalement au niveau de trois sérines (Ser 95, 192 et 199) (Idriss et al. 1994). La phosphorylation d'hnRNP A1 par l'utilisation d'une préparation de PKC conventionnelles réduit sa capacité à aligner des brins d'ADN complémentaire et son affinité pour des oligonucléotides simple brin, situation qui est renversée par l'action de la phosphatase PP2A (Idriss et al. 1994). Cette situation se reproduit avec la PKC atypique PKC ζ (zêta) où la phosphorylation de la protéine entraîne en plus son accumulation au cytoplasme (Municio et al. 1995). L'accumulation cytoplasmique d'hnRNP A1 en réponse à des stress comme le choc osmotique ou l'irradiation aux UV ne semble cependant pas impliquer l'isotype PKC ζ (van der Houven van Oordt et al. 2000). La PKC pourrait moduler indirectement les modifications post-traductionnelles de nos protéines cibles via divers intermédiaires. Par exemple, la PKC non classique PKC ϵ est essentielle à l'accroissement de l'expression protéique de Bcl-xL modulée par FGF-2 via l'intermédiaire de la voie MEK/ERK et l'activation de la kinase S6K2 (Pardo et al. 2002; Pardo et al. 2006). L'activité de Sam68 et hnRNP A1 est modulée par la voie de signalisation MER/ERK (Matter et al. 2002; Roy et al. 2014). L'activation de la PKC dans myocytes cardiaques de rat entraîne la phosphorylation des kinases FAK (Focal adhesion kinase) et FRNK (FAK-related non-

kinase). Cette phosphorylation des kinases entraîne leur relocalisation et association avec Sam68 (Yi et al. 2006). La PKC classique PKCII β , au travers de la formation d'un complexe inhibiteur PKCII β -RACK1-Src, réduit l'activité *in vitro* de la kinase, résultant en une réduction de la phosphorylation de ses cibles comme Sam68 (Miller et al. 2004).

Le niveau d'expression de la protéine hnRNP A2/B1 est lui-même modulé par Fyn puisque l'inactivation de la kinase par knock-out réduit de moitié la production de la protéine. Par ailleurs, l'activité de Fyn étant accrue dans les cellules cancéreuses pancréatiques, hnRNP A2/B1 s'y trouve surexprimée, protégeant ainsi les cellules de par son action sur l'apoptose. Cette stimulation explique possiblement pourquoi l'utilisation d'ARNi contre hnRNP A2/B1 dans les cellules BxPC3 (adénocarcinome humain du pancréas) accroît l'utilisation du site 5' xS et sensibilise ces cellules à l'action de l'oxaliplatine (Chen et al. 2011; Gu and Liu 2013). Finalement, la surexpression de la protéine hnRNP A2/B1 parvient à accroître la production de l'isoforme anti-apoptique perdue en partie par l'inactivation de la kinase. Ainsi, Fyn, par deux mécanismes différents (production accrue d'hnRNP A2/B1 et empêchement de la formation du complexe hnRNP A1-Sam68) parvient à favoriser l'utilisation du site anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses. Bien que les auteurs proposent la formation d'un complexe hnRNP A2/B1-Sam68, à l'instar de celui avec hnRNP A1, une interaction directe avec Sam68 modulable par l'action de la kinase Fyn, ainsi que l'importance de la présence de celle-ci dans la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x par hnRNP A2/B1 n'ont pas été démontrées par ceux-ci (Chen et al. 2011). Récemment, il y a été démontré qu'hnRNP A2/B1 stimule la production de l'isoforme Bcl-xL via l'intermédiaire du long ARN non-codant BC200 au sein de cellules cancéreuses mammaires (MCF-7) ayant le récepteur à l'œstrogène exprimé. En effet, la production de BC200, accrue dans des tissus cancéreux de l'œsophage, des poumons, des seins, du col de l'utérus, des ovaires, des glandes parotides et de la langue, est stimulée par l'estradiol (17 β -estradiol ou E2). Ainsi, de part une région de 17 nt complémentaire avec le 3'UTR de Bcl-x, BC200, associé à hnRNP A2/B1, permet de guider spécifiquement cette protéine vers sa cible et par le fait même, prévient l'interaction de Sam68 avec Bcl-x et la stimulation subséquente de l'utilisation du site xS (Singh et al. 2016).

La modulation de l'épissage alternatif de Bcl-x par Sam68 est régulée de diverses façons. Il a été récemment découvert que le facteur de transcription FBI-1 mentionné précédemment, au travers d'une interaction directe avec une région du domaine C-terminal de Sam68 (résidus 400 à 420), prévient la liaison de la protéine au pré-ARNm de Bcl-x et par conséquent, favorise la sélection du site 5' xL. Ainsi, la déplétion du facteur de transcription restaure l'action pro-apoptotique de Sam68. FBI-1, tout comme Sam68, est surexprimé dans les cellules issues d'un adénocarcinome de la prostate (PC3 et LNCaP) comparativement à la lignée bénigne (BPH1, cellules épithéliales de la prostate). Cette association inhibitrice entre FBI-1 et Sam68 expliquerait en partie le fait que dans des cellules cancéreuses, en l'occurrence ici PC3, comparativement aux cellules non transformées, Sam68 promeut la production de l'isoforme anti-apoptotique. En effet, la déplétion de Sam68 dans les cellules LNCaP (adénocarcinome humain de la prostate sensible aux androgènes) induit une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Busa et al. 2007). L'inhibition de la liaison de Sam68 à l'exon 2 via l'interaction avec FBI-1 ne découle pas d'un empêchement de l'association de cette protéine avec hnRNP A1, tel que mentionné précédemment, ou d'une réduction de sa capacité à lier l'ARN en général et à exercer son action régulatrice de l'épissage (une Sam68 fonctionnelle est nécessaire pour moduler l'impact de FBI-1 sur l'épissage de Bcl-x). Elle nécessiterait plutôt l'activité d'histone désacétylases (FBI-1 peut s'associer avec HDAC 1, 2 et 3), car l'utilisation d'inhibiteur (LBH589) récapitule l'effet de la déplétion de FBI-1 sur l'action de la protéine Sam68 et sa capacité à lier le pré-ARNm de Bcl-x (Bielli et al. 2014). Le niveau d'expression de Sam68 serait aussi régulé par Bcl-xL via une possible rétroboucle. En effet, dans les cellules SH-SY5Y (neuroblastome humain de la moelle osseuse), la surexpression de l'isoforme Bcl-xL entraîne une réduction de moitié du niveau d'expression de la protéine Sam68, ce qui engendre par le fait même un accroissement de la production de l'isoforme anti-apoptotique (Anderton et al. 2012).

Plusieurs points devront être éclaircis au niveau de ces modèles de remodelage de la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x en situation de stress, en particulier dans le cas de la staurosporine où peu a été effectué dans l'établissement d'un modèle de régulation. Qu'en est-il du niveau de phosphorylation de certains résidus contenus dans les protéines

Sam68 et hnRNP A1/A2 ? Est-ce que la phosphorylation est affectée par l'activation de la DDR ou l'inactivation de la PKC ? Est-ce que le niveau de phosphorylation de ces protéines a un impact sur leur capacité d'association mutuelle comme nous le postulons ? Qu'en est-il des interactions avec et sans drogues de Sam68 et hnRNP A1/A2 avec les autres composantes du complexe de régulation (SRSF10, 14-3-3 ϵ , RNPS1 et hnRNP F, H et K) ? Est-ce que la liaison de RNPS1 au pré-ARNm de Bcl-x est affectée par l'emploi des drogues. Du côté de la staurosporine, l'ensemble des expériences effectuées dans le cas de l'oxaliplatine et présentées dans le chapitre I de cette thèse, ainsi que dans l'article précédent du laboratoire (Shkreta et al. 2016), devront être reprises afin de démontrer l'existence d'un complexe de régulation similaire. Comme TCERG1, hnRNP A1/A2 et Sam68, SRSF10 pourrait être un autre des effecteurs communs aux voies de signalisation de la DDR et la PKC dans leur régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x. En effet, la sérine 133 de SRSF10, celle même qui est déphosphorylée par l'emploi de l'oxaliplatine, est située au sein d'une région correspondant à la séquence consensus cible pour une phosphorylation médiée par de nombreuses kinases dont PKC (Shi and Manley 2007; Shkreta et al. 2016). L'importance de la protéine SRSF10, de même que 14-3-3 ϵ , dans l'accroissement de la production de l'isoforme courte pro-apoptotique Bcl-xS suite à l'inhibition de la PKC reste à être déterminée. Ainsi, pour répondre à ces questionnements, nous proposons d'effectuer des expériences d'immunoprécipitations de l'ARN, de co-immunoprécipitations et de déplétions combinées à l'ARNi de plusieurs facteurs (pour confirmer la synergie), en plus de vérifier par immunobuvardage de type Western le niveau de phosphorylation et l'identité des résidus phosphorylés contenus dans nos protéines cibles.

Dans l'optique de déterminer si ce modèle de régulation de l'épissage alternatif en situation de stress s'appliquait à d'autres ASEs impliquées à l'instar de Bcl-x dans le devenir de la cellule, nous avons étudié l'impact de la déplétion des protéines cibles sur l'altération stimulée par l'utilisation des drogues des profils d'épissage de transcrits codant des protéines impliquées dans l'apoptose cellulaire, le DDR et la régulation du cycle cellulaire. De ces unités subissant une altération de la régulation de l'épissage par l'emploi de l'oxaliplatine ou de la staurosporine, la majorité sont sensibles à la déplétion par ARNi

d'hnRNP A1/A2 et/ou de Sam68, avec près de 50% coréglées par les deux protéines (20 sur 37 pour les unités réactives à l'oxaliplatine et 11 sur 23 pour celles réactives à la staurosporine). Cette corégulation peut être synergique, comme dans le cas de Bcl-x ou CHEK2, ou antagoniste, tels que pour MAP2 et RBBP8. Dans le cas des unités sensibles à l'oxaliplatine, plusieurs d'entre elles avaient aussi été démontrées par le passé dans notre laboratoire comme étant régulées par SRSF10 et hnRNP F/H (Shkreta et al. 2016).

Lorsqu'on compare les résultats obtenus avec l'oxaliplatine et la staurosporine, on peut constater tout d'abord que la polarité du changement induit par les deux drogues, lorsqu'il y a lieu, est la même pour l'ensemble des événements d'épissage alternatifs testés. De plus, l'impact de la déplétion des facteurs d'épissage hnRNP A1/A2 ou Sam68 (*anti*, *co-opt*, *same* et *reconfig*) pour les ASEs doublement réactives aux deux drogues est conservé dans ces deux conditions (oxaliplatine ou staurosporine) lorsqu'il y a effet du siRNA. Ainsi, l'ensemble de ces résultats soutient une convergence des voies de la DDR et de PKC au travers d'effecteurs communs présents dans le complexe pro-apoptotique découvert chez Bcl-x. Cette convergence présente pour des unités impliquées dans la régulation de la DDR, de l'apoptose et du cycle cellulaire permet une coordination rapide et adaptatrice en situation de stress pour la production de variants d'épissage importants pour la destinée de la cellule.

Tel que nous en avons discuté dans l'introduction de cette thèse, la cellule eucaryote doit faire face au quotidien à diverses situations de stress telles que les stress génotoxiques menaçant l'intégrité génomique de celle-ci. Afin de surmonter ces obstacles et dans une optique d'adaptation rapide afin d'assurer sa survie, un important remodelage de la régulation de l'épissage alternatif est de mise. Ce remodelage se manifestera principalement au travers d'une régulation de l'expression de facteurs d'épissage et de l'induction de modifications post-traductionnelles affectant l'activité et la localisation de ceux-ci (Shkreta and Chabot 2015). L'utilisation de cisplatine stabilise la protéine SRSF2 en réduisant l'acétylation de certains résidus lysines qui guide normalement le facteur d'épissage vers une dégradation par le protéasome et accroît sa phosphorylation par le recrutement au noyau des kinases SRPK1 et 2 (Edmond et al. 2011). Chez la drosophile, l'utilisation de

camptothécine réduit l'expression protéique du facteur d'épissage Tra2 par augmentation de sa dégradation par le protéasome suite à une possible ubiquitination de résidus lysines, altérant ainsi le profil d'épissage de TAF1 (Katzenberger et al. 2009). L'emploi de la mitoxantrone (inhibiteur de topoisomérase) mène à la relocalisation des protéines Sam68 et hnRNP A1 au sein de granules de stress cytoplasmiques et nucléaires dans les cellules cancéreuses PC3 et HeLa. Cette relocalisation résulte en des changements dans le profil d'épissage de certains événements régulés par ces protéines tel que CD44 (Busa et al. 2010). De même, une exposition aux rayons UV-C entraîne la phosphorylation d'hnRNP A1 par les kinases Mnk 1 et 2 suite à l'activation de la voie de signalisation p38 MAP kinase et son accumulation et relocalisation au niveau des granules de stress cytoplasmiques. Cette irradiation aux UV entraîne dans le cas de la protéine associée à l'ARN polymérase II EWS une séquestration au nucléole, interférant ainsi avec la régulation de l'épissage alternatif de cibles tel que le récepteur de la voie apoptotique extrinsèque FAS (Paronetto et al. 2011; Paronetto et al. 2014). L'induction de stress génotoxiques peut mener à une altération de l'élongation transcriptionnelle qui, en accord avec le modèle de régulation cotranscriptionnelle, peut altérer le profil d'épissage de nombreux événements (Shkreta and Chabot 2015). L'induction de dommages à l'ADN par le rayonnement ultraviolet (UV) va, au travers d'une inhibition de l'élongation par une hyperphosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN pol II, altérer le profil d'épissage d'ARNm impliqués dans le devenir de la cellule, à savoir les gènes apoptotiques caspase 9 et *Bcl-x* (Munoz et al. 2009). Cette altération de l'élongation transcriptionnelle suite à des stress génotoxiques pourrait aussi résulter de remodelages épigénétiques au niveau de la chromatine qui, outre l'impact sur l'élongation, altéreraient le recrutement de facteurs d'épissage (Shkreta and Chabot 2015).

En conclusion, nos travaux ont permis de jeter un peu de lumière sur l'un des aspects encore sous-étudiés de la régulation de l'épissage alternatif, à savoir la contribution combinatoire de plusieurs protéines liant l'ARN (RBPs) dans la régulation de l'épissage alternatif d'événements spécifiques et le remodelage de leurs associations régulatrices face à différents stress. Un premier exemple de ce remodelage d'interactions suite à un stress génotoxique avait été montré dans le cas d'EWS. L'utilisation de camptothécine, un

inhibiteur de la topoisomérase I, entraîne une perte de l'interaction entre le facteur d'épissage YB-1 et la protéine EWS associée à l'ARN polymérase II et donc un découplage des processus de transcription et d'épissage alternatif. Cette altération à la régulation cotranscriptionnelle de l'épissage alternatif provoque l'exclusion de nombreux exons de l'ARNm de MDM2, une ligase d'ubiquitines, réduisant ainsi son expression et permettant une accumulation du facteur transcriptionnel p53 (Dutertre et al. 2010). Nos travaux ont permis d'une part de soutenir l'existence de ces larges regroupements de protéines régulatrices, à l'image de celui comprenant les protéines RBFOX et hnRNP M (Damianov et al. 2016), et d'autre part de démontrer que la composition de ceux-ci est dynamique et sujette à changement face à des stress. Dans le cas de l'inactivation de la voie de la PKC et de l'activation de celle de la DDR, ce dynamisme dans les interactions semble être centré sur le contrôle de la phosphorylation de certains effecteurs clés. L'existence d'effecteurs communs partagés entre Bcl-x et d'autres transcrits codant pour des protéines impliquées dans la régulation de la DDR, de l'apoptose et du cycle cellulaire soutient la présence d'un réseau permettant une reprogrammation concertée de l'épissage alternatif en vue de la production de variants d'épissage impliqués dans la survie de la cellule.

Nos résultats illustrent bien comment les stress génotoxiques peuvent altérer de manière transitoire la régulation de l'épissage alternatif de nombreux pré-ARNm impliqués dans le devenir de la cellule. Ces stress génotoxiques pourraient tout aussi bien altérer de manière permanente le profil d'épissage de transcrits, ne serait-ce par en autre une instabilité génomique accrue. L'exemple du gène Bcl-x illustre bien, de par la présence de nombreuses régions régulatrices comment une mutation engendrée par de l'instabilité génomique qui survient dans des regroupements de séquences régulatrices pourrait avoir un impact important sur la régulation d'un événement d'épissage alternatif.

La déplétion de RNPS1 permet d'accentuer l'altération permanente des profils d'épissage alternatif

Comment l'épissage alternatif peut conférer des propriétés nouvelles et adaptatrices qui permettent aux cellules eucaryotes de s'adapter demeure une question ouverte à laquelle

nous désirions s'attaquer dans notre laboratoire. L'instabilité génomique peut possiblement accélérer l'évolution des profils d'épissage en créant des mutations qui affecteront les sites et les signaux d'épissage. Le suivi sur le long terme de la progression des profils d'épissage de nombreux événements dans des cellules en culture a permis de déterminer que ceux-ci ne sont pas stables dans les lignées cellulaires. Cette instabilité ne découle pas du caractère malin des lignées HCT116 utilisées puisque celle-ci est reproduite dans une autre lignée cellulaire intestinale en principe normale. À ce point-ci de notre étude, la raison pour laquelle ces profils d'épissage varient demeure inconnue. Une possible contribution de l'instabilité génomique intrinsèque pourrait affecter les éléments cis ou provoquer des variations cycliques dans l'expression des régulateurs d'épissage (facteurs trans).

Ce taux d'altération est variable selon la population d'événements d'épissage alternatifs étudiés. En effet, les 116 ASEs sélectionnées selon le critère d'être liées et/ou régulées par TDP-43 sont intrinsèquement plus instables que les 192 événements d'exons cassettes sélectionnés aléatoirement. Le site de liaison optimal de TDP-43 est constitué de 13 répétitions de dinucléotides (TG sur l'ADN, UG sur l'ARN) (Buratti et al. 2001). Cette composition répétée rappelle celle des VNTRS qui sont parmi les régions les plus instables du génome, prompt à un remodelage (contraction et allongement) lors de chaque réplication/duplication cellulaire (Jeffreys et al. 1988; Jeffreys et al. 1997; Jeffreys and Neumann 1997; Bois and Jeffreys 1999; Jeffreys et al. 1999; Vergnaud and Denoeud 2000). D'ailleurs, le taux d'altération des profils d'épissage des ASEs comprenant des VNTRS hautement instables est similaire à celui obtenu avec ces 116 ASEs. Cette possible instabilité intrinsèque de l'intégralité nucléotidique des séquences liées par TDP-43 pourrait constituer l'une des raisons derrière cette différence dans le taux d'altération des profils d'épissage selon le groupe d'ASEs étudiés. Une autre possibilité réside au niveau d'une altération possible du niveau d'expression de la protéine dans les lignées cellulaires utilisées au cours de ces expériences. En effet, il y a été démontré dans diverses études que plusieurs facteurs d'épissage voient une différence de leur expression selon l'identité et le caractère malin ou sain de la lignée étudiée (Shin and Manley 2002; Patry et al. 2003; Pino et al. 2003; Yeo et al. 2004; Busa et al. 2007; Venables et al. 2009). Ainsi, sans induction du shRNA, le niveau d'expression de TDP-43 pourrait fluctuer dans les cellules HCT116

naturellement, entraînant un défaut de couverture des transcrits naissants et permettant ainsi la formation de R-loops néfastes. Dans la même veine, au sein des cellules cancéreuses, TDP-43 pourrait subir des modifications post-traductionnelles qui altèrent son activité. Dans les neurones du système nerveux central atteints de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et de la dégénérescence lobaire fronto-temporale (DLFT), des TDP-43 hyperphosphorylées et ubiquitinées s'accumulent dans des agrégats insolubles nucléaires ou cytoplasmiques, altérant ainsi ses fonctions nucléaires et suggérant la possibilité à nouveau d'un défaut de couverture de l'ARN survenant naturellement (Neumann et al. 2006).

Nous avons cherché à accentuer de manière ciblée cette altération des profils d'épissage. Nous avons voulu vérifier si l'instabilité génomique obtenue par la modulation du niveau d'expression d'une RBP pouvait imposer cette évolution. Comparativement au taux d'altération observé précédemment dans les cellules en culture, la déplétion répétée de RNPS1 a accentué le taux d'altération permanente des profils d'épissage spécifiquement pour les ASEs normalement régulées par RNPS1. Au contraire, le niveau d'altération permanente des profils d'épissage pour les ASEs sensibles de TDP-43 ne fut pas accentué par sa déplétion. Il est cependant peu probable que cette ne soit exclusive qu'à la famille de facteurs d'épissage de type SR. En effet, la protéine hnRNP Npl3 empêche la formation cotranscriptionnelle de R-loops chez *S. cerevisiae*, supportant la possibilité que la famille de facteurs d'épissage à laquelle TDP-43 appartient possède aussi cette capacité préventive (Santos-Pereira et al. 2013). Cette expérience devra être reprise en ciblant d'autres facteurs d'épissage afin de vérifier si cette fonction régulatrice de la stabilité des profils d'épissage est une caractéristique omniprésente et commune à ces protéines. Notre laboratoire a déjà en sa possession une lignée HCT116 exprimant un shRNA inductible à la doxycycline contre la protéine SRSF1. Cette protéine serait donc une candidate idéale puisqu'il est connu que la réduction de son niveau d'expression dans des cellules DT (lymphoblastes de poulet) et HeLa rend ces cellules hypermutagénique (Li and Manley 2005).

Comment la déplétion d'un facteur d'épissage, en l'occurrence ici RNPS1, peut-elle entraîner une altération maintenue des profils d'épissage et ainsi participer à l'évolution de

ceux-ci? Basé sur les travaux antérieurs notamment des équipes des professeurs Manley et Aguilera, nous suggérons que la déplétion de RNPS1 génère de l'instabilité génomique suite à la formation de structures hybrides, les R-loops (Huertas and Aguilera 2003; Li and Manley 2005; Dominguez-Sanchez et al. 2011; Castellano-Pozo et al. 2012; Santos-Pereira et al. 2013). Ainsi, dans l'optique de confirmer notre hypothèse de travail, deux points majeurs restent à être résolus dans ce projet. Le premier concerne un accroissement de l'instabilité génomique suite à la déplétion de RBP. Un premier indice de ce potentiel accroissement de l'instabilité génomique fut la détection par immunobuvardage de la présence augmentée du marqueur de dommages à l'ADN qu'est la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX. Ce résultat reproduit celui obtenu avec SRSF1 (Li and Manley 2005). Selon notre modèle, l'instabilité génomique devrait se manifester par une présence accrue de mutations spécifiquement au niveau des unités sensibles comparativement à la situation présente dans le cas des unités non-sensibles. Le séquençage de plusieurs clones de l'unité sensible ADARB1 construits à partir de l'ADN génomique de cellules ayant subi plusieurs vagues de déplétion contre RNPS1 (1 mois) a révélé la présence de plusieurs mutations dont au moins une a induit un changement d'épissage alternatif. Bien que le résultat des transfections croisées (ADARB1, PPIL2, ABCD4 et IL28RA) soutienne l'implication de mutations dans l'altération perçue après plusieurs vagues de déplétion et que la présence de mutations fut détectée chez une unité (ADARB1), l'identité de ces potentielles mutations n'a pas encore été explorée. De plus, nous n'avons pas confirmé avec certitude la spécificité de cette potentielle instabilité génomique, à savoir que ces vagues de déplétion de RNPS1 avaient généré davantage de mutations chez les unités où devrait être générées le R-loop (sensibles) comparativement aux unités non-sensibles. Une production de minigènes destinés au séquençage serait laborieuse de par le fait que l'on crée ceux-ci à partir d'un réservoir d'ADN génomique hétérogène, accentuant la chance d'obtenir des faux-positifs. Ainsi, pour confirmer l'augmentation spécifique de l'instabilité génomique, un séquençage à haut débit de nos échantillons d'ADN génomique prélevés à différents temps au cours de l'expérience et comprenant de nombreuses unités des deux classes devrait être entrepris.

Le deuxième point consiste en la démonstration de l'existence et de l'implication des R-loops dans l'altération maintenue de la régulation de l'épissage alternatif. L'utilisation d'algorithmes de détection de régions optimales pour la formation de R-loops, les RFLS (*R-loop forming sequence*) n'a pas révélé d'enrichissement de celles-ci au niveau des unités sensibles comparativement aux unités non-sensibles (Wongsurawat et al. 2012). Cependant, ces prédictions sont basées sur la composition de la séquence nucléotidique idéale et ne tiennent donc pas compte de l'accessibilité stimulatrice offerte par le défaut de recouvrement protéique. La spécificité de l'effet de la déplétion de RNPS1 sur une catégorie d'unités précises (celles régulées au niveau de l'épissage par la protéine) réduit la probabilité que l'accentuation de l'altération soit due à une inactivation de mécanismes généraux de la réparation de l'ADN pour lesquels une participation directe de facteurs d'épissage a été découverte récemment (Hegde et al. 2012; Mastrocola et al. 2013; Wang et al. 2013). Sachant que les régions transcrites sont réparées plus efficacement que celles peu ou pas transcrites, nous avons utilisé la banque de données CellMiner pour vérifier le niveau d'expression de nos unités cibles dans les lignées HCT116 (Reinhold et al. 2012; Kohn et al. 2014). À nouveau, l'impossibilité de pouvoir percevoir une différence par rapport au niveau d'expression entre les unités sensibles et non-sensibles suggère que l'instabilité génomique accrue, ainsi que l'altération des profils d'épissage qui en découle, n'est pas due à une réparation moins efficace ou inactivée. La réduction de l'accroissement de la phosphorylation de l'histone H2AX par la surexpression de la RNase H est un signe de la formation de R-loops suite à la déplétion de RNPS1 et d'une instabilité génomique découlant de la création de ces structures hybrides. Malheureusement, cette surexpression n'a pas été en mesure de prévenir les changements d'épissage alternatif causés par des vagues de déplétion ciblant RNPS1. La surexpression de la RNase H, en agissant ainsi en aval du problème, n'est peut-être pas la meilleure méthode pour prévenir la formation de la structure hybride et ainsi en déceler l'importance dans l'altération des profils d'épissage.

Plusieurs méthodes existent pour détecter/visualiser la présence de R-loops. Les structures hybrides d'une taille supérieure à 150 nt peuvent être visualisées par microscopie électronique (Duquette et al. 2004). Une autre technique alternative implique une déamination de cytidines (conversion en uraciles) présentes sur le brin d'ADN non-apparié

de la structure hybride par un traitement des cellules en culture avec du bisulfite de sodium. Ce traitement permettrait de détecter par séquençage l'endroit exact où furent produites les R-loops via une présence accrue de mutations (les uraciles sont convertis en thymidines lors de la prochaine de réplication sur le brin d'ADN parental non-apparié, de même que les guanosines sur le brin d'ADN complémentaire sont converties en adénosines) (Yu et al. 2003). Les structures hybrides peuvent aussi être repêchées par immunoprécipitation (DRIP ou immunoprécipitation d'ADN-ARN) ou détectées par immunofluorescence ou immunocytochimie dans des cellules perméabilisées ou dans des étalements de chromosomes par l'entremise de l'anticorps monoclonal S9.6 (Hu et al. 2006; Mischo et al. 2011; Wahba et al. 2011; Ginno et al. 2012; Stirling et al. 2012; Bhatia et al. 2014; Sollier et al. 2014). Cet anticorps reconnaît les duplexes ARN-ADN et, avec une affinité légèrement inférieure, les duplexes ARN-ARN riches en adénosine et uraciles (Phillips et al. 2013; Zhang et al. 2015). Cette découverte récente d'une affinité pour les duplexes intramoléculaires d'ARN a amené à l'ajout d'une étape de traitement à la RNase A dans les protocoles d'immunoprécipitation, une précaution qui n'avait pas été appliquée dans les études antérieures (Zhang et al. 2015). Cette technique d'immunoprécipitation lorsque combinée à un séquençage de la portion d'ADN récupérée (DRIP-seq) permet à l'instar de la technique de modification au bisulfite de sodium de détecter avec précision le lieu de formation des R-loops au sein des unités étudiées.

Bien que ces techniques permettraient de visualiser/détecter la présence et l'accroissement de la formation des structures hybrides suite à la déplétion de RBP et possiblement un enrichissement des R-loops au sein des unités sensibles comparativement aux unités non-sensibles, celles-ci ne permettraient pas l'établissement du lien fonctionnel entre le R-loop et l'altération maintenue des profils d'épissage. L'implication de la structure hybride dans l'altération permanente du profil d'épissage des unités sensibles de RNPS1 pourrait être démontrée par une accentuation de l'instabilité génomique créée par ces structures via l'emploi de déaminases membres de la famille des APOBECs. Parmi celles-ci, la mieux étudiée et la plus employée dans un optique de détection des R-loops est l'AID. AID déamine les cytidines non-appariées, telles que celles présentent sur le simple brin d'ADN parental dans le R-loop, en uraciles (Muramatsu et al. 1999; Muramatsu et al. 2000;

Petersen-Mahrt et al. 2002; Bransteitter et al. 2003; Pham et al. 2003). Ces uraciles seront convertis en thymidines lors de la prochaine ronde de réplication, entraînant un mésappariement avec les guanosines du brin d'ADN complémentaire. Ce mésappariement sera détecté par la machinerie de réparation de l'ADN, ouvrant la porte à l'instabilité génomique par l'introduction de mutations et par la recombinaison. Cette recombinaison joue un rôle majeur dans la diversification des anticorps. En effet, AID est normalement exprimée uniquement chez les lymphocytes B et participe à la commutation isotypique des anticorps (CSR). Elle peut cependant être exprimée dans certaines cellules cancéreuses non lymphocytaires telles que les cellules cancéreuses du sein. La CSR nécessite la formation cruciale de R-loops au niveau des régions riches en guanosines-cytidines situées entre les portions constantes et variables de la chaîne lourde des immunoglobulines. Une fois la structure hybride formée, AID va pouvoir déaminer les cytidines non-appariées et permettre une translocation qui entraînera un changement de classe (Neuberger et al. 2003; Yu et al. 2003; Di Noia and Neuberger 2007). La surexpression de cette enzyme a déjà été utilisée avec succès dans la détection de R-loops formées par la déplétion de RBPs. La surexpression d'AID chez la levure dans un contexte favorable à la formation de R-loops (par altération de l'intégrité du complexe THO/TREX) confirme la création du substrat propice à l'enzyme par la formation de la structure hybride et engendre une accentuation de la TAR et TAM générées par cette structure hybride (Gomez-Gonzalez and Aguilera 2007; Dominguez-Sanchez et al. 2011).

La surexpression de la déaminase simultanément à la déplétion de RNPS1 devrait permettre de confirmer l'implication des R-loops comme importante pour l'altération permanente. Si l'hypothèse est fondée, le résultat de cette expérience devrait varier selon la classe d'unités étudiées. Les unités non-sensibles, par le fait que la déplétion de RNPS1 n'affecte pas le niveau avec lequel les R-loops sont formées pour ces unités, ne devraient présenter que peu ou pas de cytidines non-appariées, contrairement aux unités sensibles. Ainsi, peu de mutations comparativement aux unités sensibles (détectables par séquençage pour confirmer l'existence des structures hybrides) devraient être générées au niveau de ces unités. La production accrue de mutations au sein des unités sensibles devrait accroître les changements de profils d'épissage alternatif de ces événements d'une façon encore plus

forte que la déplétion de RNPS1 seule. Un tel résultat serait indicatif de l'existence des R-loops et de leur implication dans le processus de changement des profils.

En conclusion, nous avons montré qu'une vague de déplétion contre RNPS1 permet d'accroître l'altération maintenue des profils d'épissage pour des unités normalement contrôlés par RNPS1. Ces résultats permettent de considérer de futurs liens entre les mécanismes cellulaires d'adaptation, telle que la fluctuation du niveau d'expression de RBPs et l'évolution des variants d'épissage. Dans cette optique, il est intéressant de noter qu'alors que dans de nombreux cas, l'altération de la régulation du profil d'épissage de plusieurs unités s'est traduite par un changement de ratio classique entre les variants connus, nous avons pu observer dans plusieurs cas l'apparition de nouveaux produits qui pourraient correspondre à de nouvelles isoformes. Celles-ci devront être authentifiées par clonage et séquençage. ANAPC11 produit normalement deux bandes de 206 et 143 bp. Une nouvelle bande à 290 bp a été détectée après les rondes de déplétion. Celle-ci fut clonée et séquencée pour découvrir qu'il s'agissait d'une nouvelle isoforme découlant d'une combinaison inédite d'exons. L'utilisation de R-loops et de l'instabilité génomique qui en découle pour l'acquisition de nouvelles propriétés pour la cellule est possiblement le moyen employé par le virus oncogénique KSHV pour la transformation des cellules infectées. La séquestration de l'homologue humain de la protéine TREX par KSHV entraîne la formation de R-loops qui génèrent un accroissement de la quantité de cassures d'ADN double brins à la source de la tumorigénèse (Jackson et al. 2014). Il sera intéressant de voir si l'utilisation d'autres stress (rayonnement ultraviolet, oxaliplatine ou sorbitol) peut aussi provoquer des altérations permanentes des profils d'épissage.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, soit Pr Marc-Étienne Huot, Pr Éric Massé et Pr Brendan Bell pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce condensé de mes huit dernières années passées au sein de l'équipe du Pr Chabot. Vos conseils et commentaires me seront très précieux.

Je tiens à remercier profondément Benoit pour m'avoir donné la chance de me joindre à son équipe exceptionnelle dès mon deuxième stage de baccalauréat et pour m'avoir pris son aile dans cette étape de ma vie. Tu auras été pour moi un modèle de rigueur, de dévouement, de passion et de curiosité pour la chose scientifique. Et surtout, merci pour ton immense patience, ta profonde compréhension et toute l'énergie que tu as investie dans mon projet et cheminement. J'aurais beaucoup appris sur la science et la vie en général lors de mon passage au sein de ton équipe. Je te souhaite encore plusieurs années de succès.

Je tiens à remercier fortement Johanne pour tout son travail acharné et son dévouement auprès de nous, membres du laboratoire. Sans elle, les projets présentés dans cette thèse n'auraient pu attendre le niveau où ils se sont rendus. Merci de m'avoir sentir comme ton quatrième enfant. Je remercie Jérôme et Timothée, les initiateurs de mes deux projets, de fabuleux guides dans les différentes étapes de mon cheminement. Je leur souhaite bon succès dans la poursuite de leur carrière en recherche académique. Je tiens à remercier Lulzim pour tous ces précieux conseils, anecdotes et commentaires sur la vie en général. Merci à tous les membres actuels et passés du laboratoire (Hervé, Mathieu, André-Anne, Laetitia, J-F, Felicia) pour les nombreuses discussions et moments de plaisir simple de la vie. Merci à tous les innombrables membres du département, partis et présents, et les membres du LGFUS (Mathieu, Elvy et Philippe) pour leur précieux aide, les moments de détente à l'extérieur du labo. Merci à tous mes amis hors science que je n'ai pas toujours pu voir à la fréquence que je voulais. Ces quelques moments passés avec vous sont toujours précieux.

Un gros merci à ma chère famille; Estelle, Robert, Philippe, Simon, Annabelle et ma marraine Monique, pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez témoigné au cours de ma vie. Sans vous, je ne me serais jamais rendu où je suis présentement. Je vous dois tout. Merci pour votre immense patience.

Et finalement, un immense merci à l'élue de mon cœur, ma chère chiquita hermosa. Même si mon chemin risque de s'égarer de la recherche, une chose est sûre; je ne pourrais jamais regretter d'avoir choisi de faire un doctorat, car cela m'aurait permis de te rencontrer, mi vida. Merci pour tout ton soutien, dans les hauts et les bas qui ponctuent la vie d'un étudiant gradué. Merci ton immense patience et ta compréhension. Tu es celle qui m'éclaire dans la nuit. Merci pour tout ton amour ma chérie.

ANNEXES

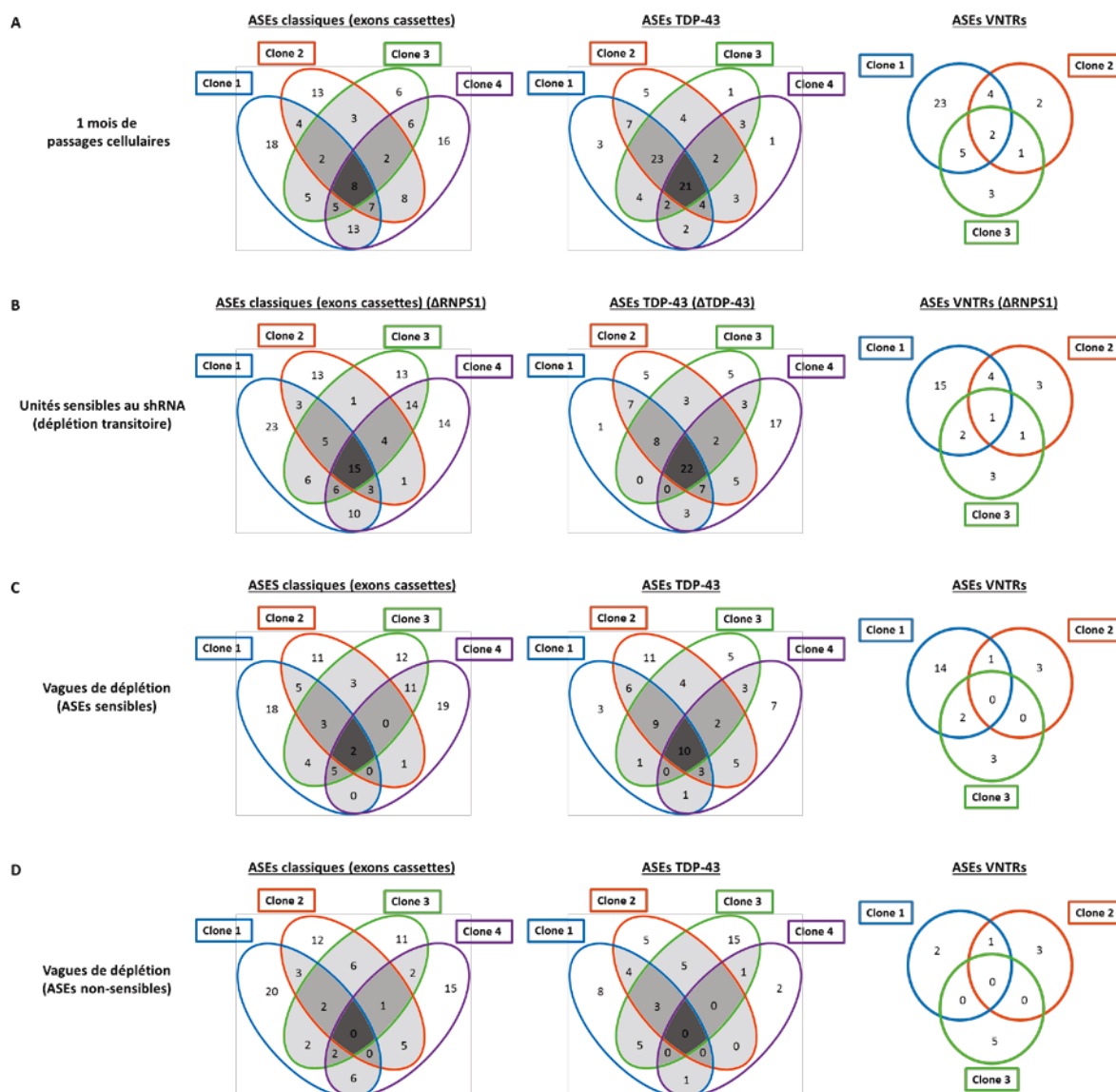


Figure supplémentaire 1: Reproductibilité de l'altération des profils d'épissage. Diagrammes de Venne illustrant la reproductibilité entre clones des résultats de l'altération des profils d'épissage après 42 jours de passages cellulaires (A) suite à la déplétion transitoire des facteurs d'épissage (B) et après un mois de vagues de déplétion pour les unités sensibles (C) et non-sensibles (D).

ASEs classiques (RNPS1)

Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces		Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces	
	Forward	Reverse	Forward	Reverse		Forward	Reverse	Forward	Reverse
APC	APC.F16	APC.R14	TCCTACAGCTACAGAGATTCAAGATG	TTCTCTACGTGACGCAAGTCTCC	FANCA	FANCA.F13		AACCTGGAAGCTGATGCTCTTTC	TATCTCTATTCTCTGTCGGG
APG5L	APG5L.u.r.9	APG5L.u.r.5	TTGCGATGTTGGTTGTTGAGG	TGTCGACGAAGAAGAGCTGGA	ACLY	refseq_ACLY.L1	refseq_ACLY.L1	AAGCTGCGCATGCGACCAAG	AGCCACTGAGGGCTGCTCTC
BTIC	BTIC.F1	BTIC.R1	ACCACCAACATCAATTAAGG	TACGAGCTGTCCGAGAAGG	ACOT9	refseq_ACOT9.F2	refseq_ACOT9.R2	CAAGGGGCGAGCTTACTCTG	CTCCCGCACTTATCTCGAA
C11orf17	C11orf17.F1	C11orf17.R1	CTCTAGAGAGTGGTCAGAG	GACATCTCTCTATGTCAG	ALDH3B1	refseq_ALDH3B1.F1	refseq_ALDH3B1.R1	AGCTCTCTGACGAGCAGCTG	CCCATCATGTGAGACCAAGG
CASCA	CASCA.F1	NM_177574.R1	GCTCAACATTTGGACAGTGAAC	CGAGGAATCATTTGAAGTCTC	APRT	refseq_APRT.F1	refseq_APRT.R1	GTGGTCTGCTGGATGATCT	AGCTGTTACTAGGCTCTTCCC
ECT2	ECT2.F12	ECT2.R11	GTGATATTGGTTCAAGAAGGTGG	CAAACTTCTCCACTGACTCCATC	APTX	refseq_APTX.F1	refseq_APTX.R1	TGAAGACAGAGTGTAAACAAGG	ACAGAGATTGGCCAGAGTT
INSR	FOX.INSR.F1	FOX.INSR.R1	ACGTTTGAGGATATCACTGCAAC	AGCCGACTCTGTCTACCAAG	BAZ1A	refseq_BAZ1A.F1	refseq_BAZ1A.R1	GCAACTAATGATGCTGACACC	AGACTGGGATGCTCAACAG
SYNE2	FOX.SYNE2.F1	FOX.SYNE2.R1	AACCGTCACTCTCTCAGTCCCT	CTGTCACTCATCTTCTTGCTG	C10orf61	refseq_C10orf61.F2	refseq_C10orf61.R2	CTTGATTCAGGCCCTCAATG	TCCCATGTGTTCTTATCTATAGG
POLB	POLB.F7	POLB.R13	TCCAAGTCTGTTACTCTCTT	CAATTCTTAGCTTACAGTCCAC	C21orf66	refseq_C21orf66.F1	refseq_C21orf66.R1	GAATCTCGGAGTTTCAACGC	TGATGCTCTGATACAGTGG
ARCD4	refseq_ARCD4.F1	refseq_ARCD4.R1	ATGCTTGATTTCTCTGACC	TGAGGGGTATGATGCGACG	CDC35	refseq_CDC35.F1	refseq_CDC35.R1	ACACTCTTCTACCTGTGTG	TCCGACCTAAATGCACTCC
ABU1	refseq_ABU1.F3	refseq_ABU1.R3	CAATGACCAAGCAGATATCTCC	CGCGTGAGTGTGGACATCA	CES2	refseq_CES2.F1	refseq_CES2.R1	CTGGCTCAAGAATCATGAGC	CCATTCTGCAAAATTTGGC
ADARB1	refseq_ADARB1.F2	refseq_ADARB1.R2	ACATGAGCCAACTCTGGAAG	ATTGGAGCGCATCGGAATC	CLTCL1	refseq_CLTCL1.F1	refseq_CLTCL1.R1	GTGAAGCTTCTACCTGGCTG	GAAAGCATCTCTCTGTGCTT
ADARB1	refseq_ADARB1.F4	refseq_ADARB1.R4	CTGGCATGGAGAGCTTAAGT	TGACTGGCGGAGAGCTGTTT	COL13A1	refseq_COL13A1.F1	refseq_COL13A1.R1	GACCAACGGGAGCAGCTG	GGCCAACTCAAGGTGAGAG
ADNP	refseq_ADNP.F1	refseq_ADNP.R1	CCTCGAGGCGGAGCTGCAAG	ACAGATTATCAACCAATGCTAC	CRK	refseq_CRK.F1	refseq_CRK.R1	CTCAGTATCGCTCTGATGG	TGAAGTCTCATCGGGATTC
AMACR	refseq_AMACR.F1	refseq_AMACR.R1	CCAAAGGCTTATTATGTCAGG	CCACATCAACATGATTTCTG	DLR1C1	refseq_DLR1C1.F1	refseq_DLR1C1.R1	TGAATGAGAGACTCTTACACG	TCTGTGCGCAACTTATGAGT
ANAPC11	refseq_ANAPC11.F2	refseq_ANAPC11.R3	GTAGGGGGGTGCGGTAAATG	AGCATCTGTAAAGGCATCAT	DMF2P541102	refseq_DM2P541102.F2	refseq_DM2P541102.R2	GCACGCTTTACTGTAGAGAG	GTGGGTGTATGGCTTCCG
AP2B1	refseq_AP2B1.F1	refseq_AP2B1.R1	TGTTGCACTACCACTGCTCA	TGATGGGATGAAGGATATGCTC	EHMT2	refseq_EHMT2.F1	refseq_EHMT2.R1	GCCAAAGAAATGTGGCGAA	CAGCGAAGATGTGTATCTG
AP3M1	refseq_AP3M1.F1	refseq_AP3M1.R1	CTCTATTACGGTGTCTTCCG	ACTGGCTCAACAGCTCTTC	ENO3	refseq_ENO3.F1	refseq_ENO3.R1	AACCTCCGCAAGACATCTC	CTTGGCCGTGTGCAAGCT
ARFIP1	refseq_ARFIP1.F2	refseq_ARFIP1.R1	GTGGATGACTCTGTGGAAGATGAC	CGGCTAGCTCTCAGAGATGAC	ERP29	refseq_ERP29.F1	refseq_ERP29.R1	AGCGGCTCGCACCAAG	CCAACTTAACCTCCCGAGTAT
ARHGAP17	refseq_ARHGAP17.F1	refseq_ARHGAP17.R1	AGCATTTGATCTACTCTACACC	GATCAGGGTCTCTCGGTTTG	GABRB2	refseq_GABRB2.F3	refseq_GABRB2.R3	GAGGGGTGGTGAACCTAACG	CTAACTACTTCTGTAATGGACCC
ARHGEF11	refseq_ARHGEF11.F2	refseq_ARHGEF11.R2	CCGAATCAGCATGATGATCC	AGGGTCTGACGATCCGAGTTC	GEM	refseq_GEM.F2	refseq_GEM.R2	CTGTGGGCCCCGGTATC	GGCGATGGTGACATTATTC
ASB3	refseq_ASB3.F1	refseq_ASB3.R1	GACCAAGCATTCTGCTGATG	GTAGTGATTGATGATCTGCC	GGA1	refseq_GGA1.R1	refseq_GGA1.R1	ACTGCGCACTGACAGAGAG	GAAGCTGTCTCATCGCTGC
ATG16L1	refseq_ATG16L1.F1	refseq_ATG16L1.R1	CCATCGGCTTATGTCAGAG	ACGAGACAGAGATGATGATCC	GMEB1	refseq_GMEB1.F1	refseq_GMEB1.R1	ATGCAAGAGATGAGTGTCCAG	CCGACGCACTCTCAATAT
ATP2A1	refseq_ATP2A1.F1	refseq_ATP2A1.R1	AGTTCTGTGCTCGGAATCAGC	GCTCTGAAGATGTGCTACTATG	GTDC1	refseq_GTDC1.F1	refseq_GTDC1.R1	CCACTCTGCATGATAATCAAG	CCCACTACACAGCTTCCA
ATP55	refseq_ATP55.F1	refseq_ATP55.R1	ACTACACCACTCTCAACAGC	GTGCTGTCTTAAAGCTGTGGAG	GT2IRD1	refseq_GT2IRD1.F2	refseq_GT2IRD1.R2	GAGCCATCTGATGATGCTAAG	GACCTCGCTCTTGTGTGTTG
BOLA3	refseq_BOLA3.F1	refseq_BOLA3.R1	ATCGGATGTGTTGCCACTAGC	GGTGACTGCTTAGGGAAGATG	GTPB8	refseq_GTPB8.F1	refseq_GTPB8.R1	TGGAAAATCATCTTAATCAAGG	GAATTCGCAACCAAGCTATCAC
BRD8	refseq_BRD8.F2	refseq_BRD8.R2	GCCAGCGCTGTAATATGATC	TTTAGGTGTGCTCAAGAGG	HNRNP9	refseq_HNRNP9.F1	refseq_HNRNP9.R1	ACCGGACACCATATGATAGCC	CCATCATCTCCCATGGCGTA
BRD8	refseq_BRD8.F4	refseq_BRD8.R4	CAGAGGGTGATATTAACCTAGT	CATGTATCATGAGTATACACC	IL28RA1	refseq_IL28RA1.F1	refseq_IL28RA1.R1	AGGAAAGAGCTCTACCAAGT	GTGAGTGTCTTGGAGGAGC
BTN3A3	refseq_BT3A3.F1	refseq_BT3A3.R1	TCCATCTGAGAACCAAGG	TCCATCTCTTCACTCTG	LOC43446	refseq_LOC43446.F3	refseq_LOC43446.R3	TGGTGGCGCGGAGAGAT	CCGTGTCTCTTGTGCTTGT
BTRC	refseq_BTRC.F1	refseq_BTRC.R1	ACCAGTGGCTCTGGCGAT	CCGTGCTGGGCAACATATA	LRD8	refseq_LRD8.F6	refseq_LRD8.R6	ATGTGACGGGGAAGAGT	CGCCACGGTGAAGGAGAC
C14orf173	refseq_C14orf173.F1	refseq_C14orf173.R1	GAAGCGAAGGAAGAAGCTG	TTTAGGAAGCAGCTGGGAGG	LRRC20	refseq_LRRC20.F1	refseq_LRRC20.R1	CTTGGCTCAACACGAGCTAAG	GTGGAAGCGGAGGTGTAGTC
C3orf17	refseq_C3orf17.F1	refseq_C3orf17.R1	ACCGTGTGAGATCTCTAAGG	AACAGGTCTTGAATGAGCC	MADD	refseq_MADD.F3	refseq_MADD.R3	CTGAAGAGCTGGGAGGTTG	TGTTGTCTGTACTGTGTGCTC
CAMKK2	refseq_CAMKK2.F3	refseq_CAMKK2.R3	CCGTATGCTGGCAAGAACG	CTGACATGAGGCTTCTCTC	MGC15875	refseq_MGC15875.F5	refseq_MGC15875.R5	ACATAGCTCTCCCAAGTCTCG	AGACTCAGGAAGAGGCTG
CD151	refseq_CD151.F1	refseq_CD151.R1	GACTCGAGCGGTGGTATG	AGCAATGTGAGTAAACAGCAG	PP1L2	refseq_PP1L2.F1	refseq_PP1L2.R1	AGGAAAGAGCTCTACCAAGT	CTTGATGTGTCTTGGAGGAGC
CCKSRA2	refseq_CCKSRA2.F1	refseq_CCKSRA2.R1	CTGCTCTCAAGTAATGCAAGC	TCCATGCTGATTTGTGTCACA	PP1L2	refseq_PP1L2.R2	refseq_PP1L2.R2	CAGATCTGGAAGTAATGATGAGC	AGGTGTGAGTGAACGAGCTG
CENTG2	refseq_CENTG2.F1	refseq_CENTG2.R2	GCAGTTCTACACATCCACCA	TGCGTGTGAAGTCTCATGATG	PRKCBP1	refseq_PRKCBP1.F1	refseq_PRKCBP1.R1	CCCTCCACTTCTCTCAATG	GACACTAGCTGATTAACCCG
CLCN6	refseq_CLCN6.F2	refseq_CLCN6.R1	CTGGATTGTGAACTTTGGC	CCGATTGACTCGAAGGAGAC	PRKCBP1	refseq_PRKCBP1.F3	refseq_PRKCBP1.R3	CCATTCTTGAAGCTCCAAC	TCCGACTTCACTGATGATCTC
CLK1	refseq_CLK1.F1	refseq_CLK1.R1	AGCAACACAGGATCAACAC	TGATGATGACTCTCAACAC	RBBP8	refseq_RBBP8.F1	refseq_RBBP8.R1	AATGTGCTCTCGCTTACTC	TGCTCACTACTTCTACTCTGT
CTBP1	refseq_CTBP1.F1	refseq_CTBP1.R1	CTCGACTGTCTCAACAGG	TTCTCATGATCTCTCTGCTG	RSU1	refseq_RSU1.F2	refseq_RSU1.R2	ACTGCTCTGCTGTCAAGTC	CCAGTGTGTGATAGTGGTAAGG
DCUN1D4	refseq_DCUN1D4.F1	refseq_DCUN1D4.R1	ATGCTGTCTGCTGAGGAGGAT	GTGCTGATGATCAATGCTG	SCMH1	refseq_SCMH1.F1	refseq_SCMH1.R1	ACCTTGTCTTGGGAGATATG	CCACTAGATGATGAGGATG
DMF2P541102	refseq_DM2P541102.F1	refseq_DM2P541102.R1	GTGGAAGCTCTCTGCTG	CTGCTGAGCTCTCTGCTG	SEC23B	refseq_SEC23B.F1	refseq_SEC23B.R1	CTGCTGAGGCTCTGATGCA	CCCTAGTAAAGCAACGCA
DMF2P76112123	refseq_DM2P76112123.F2	refseq_DM2P76112123.R2	AGTATGCCACCAAGCAGCC	GAGACTGATGCTGTTGTGG	SIABP1	refseq_SIABP1.F1	refseq_SIABP1.R1	CTGCAAGAGTCCGCGATG	GTAGACGGGACATGATG
DPP8	refseq_DPP8.F3	refseq_DPP8.R3	TTTCCCTGTGAATACCTGAG	GTGACCATATAAGCTTGGTG	SNRPB2	refseq_SNRPB2.F1	refseq_SNRPB2.R1	GTAGTCTGGGTAGGCTTAG	CACCAACACCAACATGAGA
DTN8	refseq_DTN8.F5	refseq_DTN8.R5	GTACGAGGAGAAACCTCCG	TGTCGGGCTCTCTGCTACTG	TRP1	refseq_TRP1.F2	refseq_TRP1.R2	GCTGACCTGTGCTACTG	CAGCTCCATGGGGAAGCC
EPB41L1	refseq_EPB41L1.F3	refseq_EPB41L1.R3	CAGAAACCATGATCTGAGCAG	TCCCGGACTGAGAGCTGCTC	UBE2D3	refseq_UBE2D3.F2	refseq_UBE2D3.R2	GATAGCTGTGTGATGATGATG	ACACTGTGTGCTGAGGGGTGA
ERNB2IP	refseq_ERNB2IP.F1	refseq_ERNB2IP.R1	GACGCAATGTAAGAGGTTG	CGACACCTGATATGATGATAA	VDRK1	refseq_VDRK1.F1	refseq_VDRK1.R1	GAACTCTGAGATATGAGCA	TAGCAGCAACAGGAGAGACA
FAM86A	refseq_FAM86A.F1	refseq_FAM86A.R1	CCGCTCTCTCAATATGATG	TGTGGTACTGATGAGATGATG	WAC	refseq_WAC.F1	refseq_WAC.R1	ATATGTGGTCTGATGACAG	ATGTGGTCTGATGACAGG
FBI1	refseq_FBI1.F1	refseq_FBI1.R1	AGTATGAGCTGTGATGGGCG	TGTGTTCTCTGGTATGTGAAGC	WARS	refseq_WARS.F1	refseq_WARS.R1	GACGCGCAGGAGACAGC	CAGTACGCTTATTAATCTTC
GAB1	refseq_GAB1.F2	refseq_GAB1.R2	AATTATGTCCTCAATGAATCC	TTTATTCTAAAGCGCTGGCTG	WBP5	refseq_WBP5.F1	refseq_WBP5.R1	AACCTCGGGGAATTTGAGC	CTGAGAGATGATCAATGACC
GEMIN7	refseq_GEMIN7.F2	refseq_GEMIN7.R2	GCCTCGAGTGAAGCAAGAGC	ACGTGAAGCTCATCTGATGAC	APAF1	rs.APAF1.F1	rs.APAF1.R1	CTTTGGATGTGACATGACGAA	CCACCTTTGAAGCTAGTCTGT
GIT2	refseq_GIT2.F1	refseq_GIT2.R1	ACTATGACAGCGTGGCATCA	AGGAAGAGTGTGTGAAGGTGTC	ATP2C1	rs.ATP2C1.F1	rs.ATP2C1.R1	AGCAGGAGAAAGTCCAGAGC	AGAGTTCCAAGAGTGAAGGCG
GRHL1	refseq_GRHL1.F1	refseq_GRHL1.R1	TAATCTCAAGGCGCAATCTC	GCTGATGGGATGATGATTC	ATPAF1	rs.ATPAF1.F1	rs.ATPAF1.R1	SCAGAAAAGTTGATGATCTGGAA	AGGTTCTCAATACCGTAMGT
GTF2I	refseq_GTF2I.F2	refseq_GTF2I.R2	CTTATGAGAGCTTGTGCAAG	TTTGCTCTCTTGAAGGCTGAG	RLA1	rs.RLA1.F1	rs.RLA1.R1	TGAGTACACTCTTCTCCCA	TCCACATCATCTGTGTGCT
HEMK2	refseq_HEMK2.F1	refseq_HEMK2.R1	TGTACCTAGAGACAGCAGCC	CCATGACTCTGCGACCATC	C14orf159	rs.C14orf159.F2	rs.C14orf159.R2	TGGAAGGAAGGAAGCAAGTAC	AAGGCAGGTTAAACAGGTTG
HSPD2A	refseq_HSPD2A.F5	refseq_HSPD2A.R5	CGGAATCTTACAGGACTACG	GGGCAATATGCAAGTGTCTTC	C14orf159	rs.C14orf159.F3	rs.C14orf159.R3	TGCTATGGCAATTAATCAATGCT	ATGAGTACAGGATGATAGCTGC
HNRNPAB	refseq_HNRNPAB.F2	refseq_HNRNPAB.R2	GTGGAACCCGCAACCCAG	CGCTCAGTGTGCTTGATGTT	C16orf13	rs.C16orf13.F1	rs.C16orf13.R1	AGGACACTGCTCCAGGCTC	CACTGGCTTCCNAGTCC
HP51	refseq_HP51.F4	refseq_HP51.R4	ACCTGCTGTGCTCTCTCTC	TGAGCTGTATGCGCGAGG	C17orf80	rs.C17orf80.F1	rs.C17orf80.R1	AGGCCCTTATGTTCAGCCAGC	ATGCCACCAATCACTCTTC
IL17	refseq_IL17.F1	refseq_IL17.R1	CCCCACCATGAATTTTGTC	AAAATCTCCCTTACGAGACCC	C1orf43	rs.C1orf43.F1	rs.C1orf43.R1	CGGGCTGTGCTGTGTTCTTC	AGCATCATCATCTGCAAGGAGC
IRF7	refseq_IRF7.F1	refseq_IRF7.R1	AGATCACTGCTCAACCAAGG	TACGGGCTCTCTGTGGTC	CASP8	rs.CASP8.F2	rs.CASP8.R1	TGTACCCCGCAACAGCTTC	CANGTACCACTCAAGGGCT
ITGB4BP	refseq_ITGB4BP.F1	refseq_ITGB4BP.R1	GTGTTGAGGAGCGAGCTCTC	TGGAAGTCTTGGATGTGACC	DIAPH1	rs.DIAPH1.F1	rs.DIAPH1.R1	ACCGGCGCAATCAAGGAATT	CATATGCTGTGCTGGGATGCA
KCNAB2	refseq_KCNAB2.F1	refseq_KCNAB2.R1	CTCCCCGGGATGATCTAC	ATCGGTGATCTGCTGCTTC	DMB1	rs.DMB1.F1	rs.DMB1.R1	CCCGACTACGCGCTTCACT	GACGTTTGTGCGGTCTGCG
KIF9	refseq_KIF9.F1	refseq_KIF9.R1	CTTGTGGATGTGATGGCC	TGCGTTGATCTCATCATCTG	DUSP6	rs.DUSP6.F1	rs.DUSP6.R1	CTGCTCAAGAGCTCAAGGAGC	CCGACCAAGCATCTCAACGA
LHX6	refseq_LHX6.F2	refseq_LHX6.R2	TCCGACGACATCACTACAC	TGGTGGGTTGCTGTTCTGAC	ECHDC1	rs.ECHDC1.F1	rs.ECHDC1.R1	AAATGGACAGAGGGGAAAGGC	CTCCACCAATGCCCACTTC
LIGL2	refseq_LIGL2.F1	refseq_LIGL2.R1	ACTCAGGAGTACAGATGATG	CTCGATGATCAAGCCAGTGTG	FAM13A	rs.FAM13A.F1	rs.FAM13A.R1	GAATATGAATCAAGCTAATCTTC	CTCTTCAAGGCCCCATCTC
LOC119854	refseq_LOC119854.F2	refseq_LOC119854.R2	GGGATGTGATGATGATATCC	TGCGATGATGATGATATCC	LOC11151	rs.F11151.F1	rs.F11151.R1	CCAACTGCTACTCTGTGAGG	CATGTGAGAGTGTGTGATGAG
LOMR3	refseq_LOMR3.F1	refseq_LOMR3.R2	CGCCGCTAGGGTTTGATG	CCGTTTCTTCTGCGGATTC	FOXK4	rs.FOXK4.F1	rs.FOXK4.R1	AGCCCAAGCCTCTCAGCAGC	AACTTCACTGCTTCTCTGAC
LRP8	refseq_LRP8.F2	refseq_LRP8.R2	AGCACTCTCCCAAGTACACAT	ATGCACAGGAGGAGCTGATC	HNRNP2	rs.HNRNP2.F2	rs.HNRNP2.R2	AGAGACAGAGACTGAGCGGTTG	GTAAGGTTTCTCAACAAAGC
LRRC23	refseq_LRRC23.F1	refseq_LRRC23.R1	TGCATCTTCTGAGACAGTCT	AAGGCGAGCGTTTGTATCT	IKZF2	rs.IKZF2.F1	rs.IKZF2.R1	CTTGAGCGTGAAGTGAAGTAC	TACAGTGGAGGGGCGTCCA
MAPKAP1	refseq_MAPKAP1.F3	refseq_MAPKAP1.R3	CCCTTATTCAGGTGGACCAAC	TGATGCTGATGCTGTGAATG	ILK	rs.ILK.F1	rs.ILK.R1	GGATCTCTGACCGCCGATCTC	TGCTTCTCGGTTTCTGACG
MAPKAP1	refseq_MAPKAP1.F5	refseq_MAPKAP1.R5	TCCGAGAGTGCAGAGTCTC	TGCGAGTGTGCTTAATTTGAG	INCEP1	rs.INCEP1.F1	rs.INCEP1.R1	CGCACTTACGCCCCCAAGC	CGCGCAGATTTCTCAGCGG
MARK2	refseq_MARK2.F4	refseq_MARK2.R4	ACGACACAAATCAAGGAGTAC	AGGCAACAGTCAAGGAGTAC	ITGA6	rs.ITGA6.F1	rs.ITGA6.R1	ATGACTACAGTCAAGATG	AGCTGATGATGCTGTGATGAG
MBD1	refseq_MBD1.F9	refseq_MBD1.R9	TTCATGTGTAGAGACAGAGCAGC	TTCAGGATGGGCGAAGATG	ITN1	rs.ITN1.F1	rs.ITN1.R1	GAAAGTGACGTTGAACACAG	GAAGGGACAGACACCTTGA
MEIS2	refseq_MEIS2.F4	refseq_MEIS2.R4	GTGACCAACATCGGGGATC	CATAACTCTGCGCCCAATC	ITN1	rs.ITN1.F2	rs.ITN1.R2	CTGAGAAGAGAACGAAACATTTG	GCAATCCAGGACTACTCTTG
MKNK1	refseq_MKNK1.F2	refseq_MKNK1.R2	AAGCTCTGTGTCGAGATG	GAGGGGGAAGCTCATGGA	MCL1	rs.MCL1.F1	rs.MCL1.R1	GACGGTGTGGGATGGCGTG	CTCCAGCAACCTCGCAAGG
MRLP3	refseq_MRLP3.F2	refseq_MRLP3.R2	AGACTCGCCAGGTGTGGTC	ACAGCTACAGGATTTGTAATC	MRLP5	rs.MRLP5.F1	rs.MRLP5.R1	TGCCAGTGCAGCTGTGGGCT	AGGAGCTGGGCGTGTGCTCA
MT	refseq_MT.F1	refseq_MT.R1	TACATGTGGGAGAGATTGGA	CTGGTGTGCTGAAATGAAC	NQO1	rs.NQO1.F2	rs.NQO1.R2	GTGGCTGAACAAAGAGAGCTG	CTTGTGAGAGATACATGAGC
MTNR2	refseq_MTNR2.F2	refseq_MTNR2.R2	GGGATGTGAGAGATGCTG	GTGCGAAGAGTGAATATG	NUPB	rs.NUPB.F1	rs.NUPB.R1	GTGCTCCCTACTCTGTGATG	APRKTGAGTCAAGGCTCTCAG
MTNR3	refseq_MTNR3.F1	refseq_MTNR3.R1	CGCCGCTAGGGTTTGATG	AGGTTGAGGAGAACCAAC	PCBP2	rs.PCBP2.F1	rs.PCBP2.R1	CCCAAGGCTCGATCACTC	ATTGCTGCTCTCTCTGAC
NDEL1	refseq_NDEL1.F2	refseq_NDEL1.R2	ACCAAGCATACAGAAATGAC	GGGTCAAAGCGTTTACTG	PCBP2	rs.PCBP2.F2	rs.PCBP2.R2	GATCTGCTGCTGATCTTGGGA	GTGCACTCTCAAGATGAGC
NFAT5	refseq_NFAT5.F1	refseq_NFAT5.R1	ACAAAGCGTGGTGGAGTCC	TYCTCGTGTGATGATGATG	POT1	rs.POT1.F2	rs.POT1.R2	AGCCCCATATCTCAAGCAAGG	GCTCCAAAGTTCCCTAACG
NFAT5	refseq_NFAT5.F3	refseq_NFAT5.R3	AATCGCCCAAGTCCCTCAT	CCGCTGTGCTGATCATGGA	PPARG	rs.PPARG.F1	rs.PPARG.R1	CTGAGGACACCGGAGAGGAG	TCAAAGGATGGGAGTGTCTT
NFATC2	refseq_NFATC2.F2	refseq_NFATC2.R2	GACGACACTCTGTTGATGATG	GCTCTTAAGTCTGATGATG	RAP1GDS1	rs.RAP1GDS1.F1	rs.RAP1GDS1.R1	TCCATGTGTGATGCTGGATG	TGCAATTTGAGTGGATGATG
NIN	refseq_NIN.F2	refseq_NIN.R2	GTCTTACGCTGATGATGATG	AAGCTCTGCTGATGTTGAGA	RASA	rs.RASA.F1	rs.RASA.R1	CCCTCACTGCTCTCTCTTCA	GTGTGATGACGACTCTGAC
OATL1	refseq_OATL1.F1	refseq_OATL1.R1	AAATGTGAGACTTCTGCTG	AGATGAGTCTGTGATAAGGCG	RBM23	rs.RBM23.F1	rs.RBM23.R1	ACCATCGGGAGACAGCA	CAGCTACGCTACGCTGAGC
ODFZ1	refseq_ODFZ1.F1	refseq_ODFZ1.R1	GCTTATGTGGAGAGTGGCTG	AAATCAATGACAGAAGTCTGC	RBM47	rs.RBM47.F1	rs.RBM47.R1	CTGCAACCTCACACCTG	GCTGGAACATGGAATCTGAG

ASEs classiques (RNPS1)

Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces		Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces	
	Forward	Reverse	Forward	Reverse		Forward	Reverse	Forward	Reverse
OSBP13	refseq_OSBP13.F2	refseq_OSBP13.R2	CTGACCTGGACATCTCGG	TGTTGACAAATTAGGATTGGAGG	RSRC2	rs.RSRC2.F1	rs.RSRC2.R1	GCGAAGAGACTGAAGGAGCG	IGAGGATTATCTTGGATTGATCTCT
OSBP19	refseq_OSBP19.F4	refseq_OSBP19.R4	AATGGACTAACGTGATGAAGGG	CTAAGGCATGGATCTCACTCTC	RUSC1	rs.RUSC1.F1	rs.RUSC1.R1	CAAGCAGTTGGAGCTGTGGTTT	TCGGGAAAAGGGAAGCCCT
PALM	refseq_PALM.F1	refseq_PALM.R1	ACAAAGCGATGCTCCACACAG	GTCGCTTGTGGATGAGGTT	STAT3	rs.STAT3.F1	rs.STAT3.R1	GGCCTTCGCGGAGAAACAG	CATTGGGAAGCTCTGATGAGA
PAOX	refseq_PAOX.F4	refseq_PAOX.R4	GGGAGACCTTCCASTGTG	AACCAAGAGAACGTGGAC	TMEV22	rs.TMEV22.F1	rs.TMEV22.R1	GCAACAGGGAATGAGAGCGAG	ACTGATATTTTCTGGAGGAGAGAG
PABL	refseq_PABL.F2	refseq_PABL.R2	TGGAATAACCTAAGTAGTAGGC	TGGGATCTTAGCTGACGAGAC	TMBU2	rs.TMBU2.F1	rs.TMBU2.R1	CACGTCACTTCAAAACAACCTCA	AAGTAACGCCACCACTAGCTG
PDE9A	refseq_PDE9A.F2	refseq_PDE9A.R2	CATGGTCTTCATCGACC	GCACGCTCTGATTAATCTTTC	TRAPPC68	rs.TRAPPC68.F1	rs.TRAPPC68.R1	ACTGCAAGGTTCAAGGATGAGT	AGCCACTCTGATTAAGCACA
PITPNCL1	refseq_PITPNCL1.F2	refseq_PITPNCL1.R2	TGTCATGGGTTGATGAGTGG	TGGAAGTGTGAGAGATTCTTC	UVELD1	rs.UVELD1.F1	rs.UVELD1.R1	AGTGATGTCATCTCTCAAGTGC	ACTGTGTTGGAGACTGTGGATT
PLD2	refseq_PLD2.F1	refseq_PLD2.R1	TTTGTCTGCTGATAATGAGCTGC	GCAGTGGATAATGAGCTTCCAA	VP529	rs.VP529.F1	rs.VP529.R1	GACGGTGGTGTGGCTAGTACG	ATTAGCTGGCAAGCTTGTGA
PML	refseq_PML.F2	refseq_PML.R2	CACCTCCAGGGACCTTATG	AGCCACCTCTGCTCTCTTC	WDR1	rs.WDR1.F1	rs.WDR1.R1	CAATGGAAAGTGCCTCATCTAAG	ACTGCTGTGGCAATCTGTTC
POG2	refseq_POG2.F1	refseq_POG2.R1	ACCTGTTCATGGAATGTGAGG	TGGTGAATAGCATGTTGGC	ZFYV27	rs.ZFYV27.F1	rs.ZFYV27.R1	AGTCTCCACACAGATGTT	TCTCACTCTCTCCAGCT
SMN2	refseq_SMN2.F1	refseq_SMN2.R1	CTTCCCATATGTCCAGATCTC	GTGGTGTCATTAGTGCTGCTC	ZNF421	rs.ZNF421.F1	rs.ZNF421.R1	AGCTGGGTTTCAAGCGAGTT	AGTTGTTTGGAGCATGGCGAT

ASEs classiques liées par TDP-43

Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces		Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces	
	Forward	Reverse	Forward	Reverse		Forward	Reverse	Forward	Reverse
BC12113	113117	BC12113-4	TACCTCTACAGACAGAG	CTCTCTGATTAATGAGCT	KULH5	refseq_KULH5.F1	refseq_KULH5.R1	AATCTGATTCACTGATCGAG	GGTCAAGACACAAACGAA
ASAP2	ASAP2.eac.F1	ASAP2.eac.R1	GATGCCGGACAGATCTCCGTG	TCATCCCATGGAGCTTGGCGTG	MSL1	refseq_LOC319287.F1	refseq_LOC319287.R1	ACCGTTACCATCTAGCGGAATC	AAGGTCTGAAGGATTGGGTC
BRCA1	BRCA1.eac.R2	BRCA1.eac.R2	AGCCTTCTAACAGCTACCTCT	CGAGACACCTCAACTGTTCAG	LNPI	refseq_LOC348801.F1	refseq_LOC348801.R1	GAAACCTCCCTGCGCTTG	LTNGCCTTCAAGGACTGTC
CENPO	CENPO.eac.R1	CENPO.eac.R1	GGTTTGAAGACGTGGATGG	7CTCGCAGACCTGATGTT	MADD	refseq_MADD.F3	refseq_MADD.R3	CTGGAAGCTGGTGAAGGGTGG	TGGTGTCTTGATCTGTGCTC
CLUP1	CLUP1.eac.F2	CLUP1.eac.R2	ACACTCAGCGAGAGAGGAT	CTGCTTGCACATCTATCTCA	MAPK8IP3	refseq_MAPK8IP3.F1	refseq_MAPK8IP3.R1	CCTGTACCTAGAGCTGTGCA	CCCACTCTTTGCCATTC
DAG1	DAG1.eac.R1	DAG1.eac.R1	CTGCAACATCTCGGTGTGAGG	AGCGAGAGGCCACAGACATC	MAPT	refseq_MAPT.F2	refseq_MAPT.R2	CCATGCGAGACTGAAGAT	ACACTTGGAGGTCACTTGC
DRI1	DRI1.eac.R3	DRI1.eac.R3	CGGGAAGAGAGGATGATG	CTCTCTGACCATCTTCA	MBP21	refseq_MBP21.F1	refseq_MBP21.R1	TTGGTGATGCTGAGTGATA	GGGATGCTTCAACTGTGCA
FAM114A2	FAM114A2.eac.F1	FAM114A2.eac.R1	ACCGGAGTGGCTGCGCTG	ATTCTTGGCTGCTACAGT	MBP24	refseq_MBP24.F2	refseq_MBP24.R2	AGAAAGTGGTCCAGGCGCTG	AGAGTCACTGGATGTECCA
INSR	FOX.INSR.F1	FOX.INSR.R1	ACGTTTGAGGATCACTTGACA	AGCCAGCTCTGTCTCACCAC	MYADM	refseq_MYADM.F1	refseq_MYADM.R1	GCTGTGCTTTGCTTCAAG	CACGGGAAGAGTCTGGTG
GEMIN7	GEMIN7.eac.F1	GEMIN7.eac.R1	TGTAGTGACATTAATTCATATC	CCCTACACCTTATCTGGAC	NUP35	refseq_NUP35.F1	refseq_NUP35.R1	TGATGACATTTCTAGCCGAG	AACGAATATGATCAATCTTC
GPBP1L1	GPBP1L1.eac.F1	GPBP1L1.eac.R1	CCATTTTGGGAAGAGCTTGA	CAATCATTTGAAAGGCCACA	OPRL1	refseq_OPRL1.F1	refseq_OPRL1.R1	ATATGCTGCTTGGCCAGCT	CCGTAGATAAATCCCAAGAG
HNRNPAB	HNRNPAB.F1	HNRNPAB.R1	GAAGTCTATCAGCAGCAGCA	GCACATGGGACAGGACATA	OSBP15	refseq_OSBP15.F1	refseq_OSBP15.R1	AACCTACCGCAGGAGAGAGAG	CCACGCTCTCACTTTGG
HP1BP3	HP1BP3.eac.F1	HP1BP3.eac.R1	AAAGGAGGAACTGGAATGT	GCCGCAAGAGAAATGTTT	PALM	refseq_PALM.F1	refseq_PALM.R1	ACAAGAGAGTCTCAACAG	GTCCGCTTTGTGGATGATT
KIF1B	KIF1B.eac.F1	KIF1B.eac.R1	AAGACCTCTTCTGCTCTCA	CTGCAAGCCACCTGACTACT	PDPL1	refseq_PDPL1.F1	refseq_PDPL1.R1	TGCAACCTCCAGAGATATG	CTCTTACGCGGACTCTTCC
LSM14A	LSM14A.eac.F1	LSM14A.eac.R1	ACTCCAGCTAGGCGGTGAGCG	GGTCTTAACGTAGGCGTTCAGG	PLCB1	refseq_PLCB1.F1	refseq_PLCB1.R1	AGAAGCGCAAGTAAACGG	TTCCAGGGGTCTGAGGACG
MAST2	MAST2.eac.F1	MAST2.eac.R1	CCCGGAATTTCTTCCAAAT	CTGAAAGAGGGGACGAAGG	POLDIP3	refseq_POLDIP3.F1	refseq_POLDIP3.R1	GCTCAAACTGGGAGTCAAGG	AGGAACGGAAGTATACCATCA
MEF2D	MEF2D.eac.F1	MEF2D.eac.R1	AGGCAGGAAAGGGGTGAATG	CTGAGTAACTCGGCTGATG	RBM38	refseq_RBM38.F1	refseq_RBM38.R1	CTGAGAGGGGCTCTCAAGAG	GTGGCTGGTGGATGATAGT
NAV2	NAV2.eac.F1	NAV2.eac.R1	CGACTCTTGATCTCCCTTG	CTGCAAGATGGGACGCTAAC	RNF14	refseq_RNF14.F4	refseq_RNF14.R4	GGCAAGTATTACGATGAGATG	TTCAAGTATCTAGGGCTCTTCC
NCOR1	NCOR1.eac.F1	NCOR1.eac.R1	CTCTGTGAGGACCAACAC	GCTGTATATAAGCTGGGAG	RWD1	refseq_RWD1.F1	refseq_RWD1.R1	GTATACACAGATTAGGGGAGG	AGGAGGGTGGATCAATGTG
NOTCH3	NOTCH3.F2	NOTCH3.R2	GAACCCCTGTGAGCTGAGTG	CTGCTGTCTGAGCTGGGAAG	SCIB	refseq_SCIB.F1	refseq_SCIB.R1	GATCCACAGATGTCTCCAG	CTGGAGAGTGTCCAGGG
OGT	OGT.eac.F1	OGT.eac.R1	AAGAGGCAAGCATTTTGAC	GGCAACCTGCTCTTCAATG	SMARCA2	refseq_SMARCA2.F1	refseq_SMARCA2.R1	TGAACGCTATCATGATCTGTG	TCAGGTTGAAGCTGTGAGC
PILRB	PILRB.eac.F4	PILRB.eac.R4	CTGCTTCCAGCTCCCTTAT	CTCTACCTGCTCTTCCATC	ST7	refseq_ST7.F1	refseq_ST7.R1	CCCAAGCTAGGATTTCTGCA	TGGGCTTCACTTGGGATC
PUM1	PUM1.eac.F1	PUM1.eac.R1	CGATGGCTCTAGGGGATGAC	CATCACTGCTGATCTCTTGG	SYF2	refseq_SYF2.F1	refseq_SYF2.R1	GTGCTCTATCTTGTGCGG	TCTCTCTTCCGCCACATTC
RABGEF1	RABGEF1.eac.F1	RABGEF1.eac.R1	CTGCAAGCAAGACACAGAT	GCACAGGAGATCGGATGAT	TCAL8	refseq_TCAL8.F1	refseq_TCAL8.R1	GTGACCAAGGAGTGCAGTG	TGGTACATCTCTCCAAAGGGC
ROL1	ROL1.eac.F1	ROL1.eac.R1	GACGGAGTGAAGGATCAAA	CCACAGGTTCATCTTCAATC	TCF20	refseq_TCF20.F2	refseq_TCF20.R2	AGGAAATCTCTGATGAGTG	CTGACGGTGGAGTCTTCC
SLC3A8	SLC3A8.eac.F1	SLC3A8.eac.R1	GGCACTCTCCGCTTTTGATG	AAAGCAGCAGTCTTGTGGA	WBP5	refseq_WBP5.F1	refseq_WBP5.R1	AACTGGGGGAATTTTGAG	CTGGAGAGTGAATGATGCG
SNHG17	SNHG17.eac.F1	SNHG17.eac.R1	CTGACTCTGTCTGTGTGTC	GCTTCCCTCAATATCCAA	WBSR1	refseq_WBSR1.F1	refseq_WBSR1.R1	CTGTGGGCGATCGGTCACT	GCTGGGCGACTACTCC
SRSF2	SRSF2.eac.F1	SRSF2.eac.R1	GCAGTGTAAACGGAGGAGTGTG	GACTGGAAAGTGCAGTGTGAG	XRCC4	refseq_XRCC4.F2	refseq_XRCC4.R2	ATTATGATCACTGCCGAG	TGGGTTGAGAAAGAGGTG
STAR4	STAR4.eac.F1	STAR4.eac.R1	CTGTTTGGAGAAACCTCAGAG	CTGTGCAAAAGACTGTGGTTGG	YTHDC1	refseq_YTHDC1.F1	refseq_YTHDC1.R1	GATTATGACACTGGAAGTGGG	AGGGAGCGTGGAGCATACAC
TRAPPC9	TRAPPC9.eac.F1	TRAPPC9.eac.R1	GAACTGGTGGAGAGGTGGA	TTTTCAGCTGCGCATCTCA	ZKRN82	refseq_ZKRN82.F1	refseq_ZKRN82.R1	GAGCAACAAGATCAGGTGAC	AAAGGCATGCTCTTACTAGC
UNC4A	UNC4A.eac.F1	UNC4A.eac.R1	GGGAGATGAATGTGAGAGAGG	CAGATCTCAGCAAGAAATGAA	ANR012	rs.ANR012.F1	rs.ANR012.R1	TGCACTCAAGCAAAATCA	AAGAAGTGCATCTGTTTGGC
CASP9	primer-113212	primer-113213	TCTCTTGTAGGACACAG	GGACACAAGATGTACTGG	ARL13B	rs.ARL13B.F1	rs.ARL13B.R1	TCGATGAGTGAAGTGGTGGGA	CAGCTTCTTAAAGCTCTCTT
ACLY	refseq_ACLY.F1	refseq_ACLY.R1	AAGCTCGCTGCTGACCAAG	AGCCACTGAGGGCTGTGTT	ATG9A	rs.ATG9A.F1	rs.ATG9A.R1	AGTAGTGGCAGACACCCGG	CCCTCTCCACCTTGACAC
AP251	refseq_AP251.F1	refseq_AP251.R1	TGATCGAGGAGGTGCTATG	CTGCTGTGCTCTGCTGATC	ATP2C1	rs.ATP2C1.F1	rs.ATP2C1.R1	AGCAGGGAAGAAATCCAGAGC	AGAGTTCGAAGATGGAAGGGC
ARMCK3	refseq_ARMCK3.F1	refseq_ARMCK3.R1	AAGGAATTTTCCGCAATG	AAATCGACTTCAACGATTAG	FAM160A2	rs.C11orf56.F1	rs.C11orf56.R1	TCCTTAATCCCAAGCTGTGTC	AGAGAGCCAGCAGAGATGGT
ARRB1	refseq_ARRB1.F1	refseq_ARRB1.R1	GTGAGGGAAGGTGCGCAAC	GGGTGCTAAGGTTGGTAAG	CREBBP	rs.CREBBP.F1	rs.CREBBP.R1	AAGCAAAAGGAGAGTGGGCTG	GCTGGGCTTCTGGGATTTGGG
ATP11C	refseq_ATP11C.F2	refseq_ATP11C.R2	TTCTGTATCAGATGTTGGTGC	CATAGGAGTTCAGATTGCG	RAP1AP2	rs.GARN14.F1	rs.GARN14.R1	TGGAGTTCTTGAGATCTGTCG	AAATGTGTGGGCTGAGTTGT
ATP9VB2	refseq_ATP9VB2.F2	refseq_ATP9VB2.R2	CTGGGACAGCTTTGTAGTCT	CAGGTTGGACCATGAGAG	GRP98	rs.GRP98.F1	rs.GRP98.R1	TGGGACATCGCGAATTTACT	ACCCATAGTACCTCCACAGA
BRD8	refseq_BRD8.F2	refseq_BRD8.R2	GCCACGAGTGTGATTATGC	TTTAGGTTGGCTCAAGAGG	MAPK14	rs.MAPK14.F1	rs.MAPK14.R1	GCGAGCTGTGATCTGGAAGAA	AATCCAATCAAGCATCTTCCA
BTRC	refseq_BTRC.F1	refseq_BTRC.R1	ACCAGGCTGGCTGGGAGT	CCGTTGCTGGGCAACATCA	MOB4	rs.MOBK13.F1	rs.MOBK13.R1	AGTGTGAGGCGGAACAGCG	TTCCACACCTTCTCTTGGC
CDKSRAP2	refseq_CDKSRAP2.F1	refseq_CDKSRAP2.R1	CTGCTCTCAGAAATGACAAGC	TCCATGGGATTTGTCTACCA	NR6A1	rs.NR6A1.F1	rs.NR6A1.R1	TCAGGATGAATTGGCAGAGCTT	GATTCATCCATAGTGAAGCT
CHKA	refseq_CHKA.F1	refseq_CHKA.R1	TCCCTACCTGACACACAGC	TGGCAACAATAAGCTCTTC	NRD1	rs.NRD1.F1	rs.NRD1.R1	AGCCACCAAGCAATACG	CCCACTCAACACAAGAGCC
CHTR	refseq_CHTR.F1	refseq_CHTR.R1	TCCCTGCTCTGCTGCTG	GTCGCTTGGGCGTACACATG	NSL1	rs.NSL1.F1	rs.NSL1.R1	TGGACCTAAATATACCTTGATCC	CTCTGGGCGAGTCTTATGG
COL4A3BP	refseq_COL4A3BP.F1	refseq_COL4A3BP.R1	GTGGGACACATGATTTGATC	GCCTTATCTACTGATGGTAGC	PEL1	rs.PEL1.F1	rs.PEL1.R1	CGCTCTCCCTCCCTCCG	GCTTCTGCTCCACTGTGCA
CNNK1A	refseq_CNNK1A.F2	refseq_CNNK1A.R2	GGGTATTGGCGCTCACTGTAAT	AGCTAGCATATGCGGGAGT	PRR3	rs.PRR3.F1	rs.PRR3.R1	AGCAGATCATCACGCCAC	GCCAAGCCCTCCGGAATTG
CNNK2A1	refseq_CNNK2A1.F2	refseq_CNNK2A1.R2	AGCTCGCTCTGTGCTTCTG	AGACAGAGTTGGCGGACAAG	RP524	rs.RP524.F1	rs.RP524.R1	ACGAAAGGAAGCAAGAACAGA	GCCACAGCTAAATCATTCGAG
CTTN	refseq_CTTN.F1	refseq_CTTN.R1	ACAGACAAGACAAGATGTGCC	TATCAGCTGATCTCTTCTG	SENPE	rs.SENPE.F1	rs.SENPE.R1	CGCAAAATAGCTTATGTTCTGGA	TGGACATGAGGTGGATTCTTCT
DDX47	refseq_DDX47.F2	refseq_DDX47.R2	CCGCTTCTCTTAATACAGAGAG	GTATGTCCAACTCGCGCTG	SERPINB8	rs.SERPINB8.F1	rs.SERPINB8.R1	AGGAGGAATGTCAAAGCAGCAG	TGGCTATTGCTTCAAGAGGTC
DTN8	refseq_DTN8.F5	refseq_DTN8.R5	GTACGAGGAGAAACCTCCG	TGTGCGCTCTCTCTGTAAC	SOSM2	rs.SOSM2.F1	rs.SOSM2.R1	CTGTGATATGTGGAGGATGAGC	TGGACAGGTGGCGGAGTGT
EWI8L1	refseq_EWI8L1.F1	refseq_EWI8L1.R1	CAGCAAGCTCAAGATCAAT	GCCACATATCTAGAGTCACTG	SNJ2	rs.SNJ2.F1	rs.SNJ2.R1	CTGTGATATCTGATCTGAGT	GTCTCATGCTTCTTAGTGCTG
AGRL5	refseq_FUJ21839.F1	refseq_FUJ21839.R1	CATGGTAAATGGGAAAGTATC	CTGTGTTAGCAGAGCAGATC	SNUPN	rs.SNUPN.F1	rs.SNUPN.R1	CGTTGAAGCGAGGAATAAGCGC	TTTACTGGGATAGCGGGG
GTF2IRD1	refseq_GTF2IRD1.F2	refseq_GTF2IRD1.R2	GAGCCCATCATGATAGTACAG	GACCTCGCTCTTCTGATGTTG	SOD2	rs.SOD2.F1	rs.SOD2.R1	CGGTAGACAGCAGTACAGC	ACCAAGTCAGTTTATGGTGT
GTF3C2	refseq_GTF3C2.F2	refseq_GTF3C2.R2	GGACCAAGCAACGTGTTTAT	AGGGCAACATCCGAGTCT	STAG2	rs.STAG2.F2	rs.STAG2.R2	TGCAGACACCAACTCACTCT	AGATCTCAATCTCTCTCTGA
HDAC7A	refseq_HDAC7A.F2	refseq_HDAC7A.R2	CCCAATCCCATCTGGGCG	CTGGGCTGCAAGCATG	TIA1	rs.TIA1.F1	rs.TIA1.R1	TCAAGATGAATTGGGCAACAC	TCAGTTGTAATTTTGGGCTGAGA
HOMER2	refseq_HOMER2.F1	refseq_HOMER2.R1	CGAGACTCAAGTATCATCTTC	CTCTGCTGAGGCAATCTTC	TNMF558	rs.TNMF558.F1	rs.TNMF558.R1	CCCTTCGGCAACCTGAT	CGGCTAGTTAAGGTTGTAATGG
IGSF3	refseq_IGSF3.F2	refseq_IGSF3.R2	TCCGCAAGAGATGATCTTC	TCCAGTAGGAGAGGCTG	TPD3L2	rs.TPD3L2.F1	rs.TPD3L2.R1	AGTCTTGTCTGCTGCTGAGA	AGTCTTGTCTGCTGCTGAGA
KCNQ3	refseq_KCNQ3.F1	refseq_KCNQ3.R1	GGCAGACCACTTCACTCAT	CTTACTAGAGCGGAGCAGC	UBT1	rs.UBT1.F1	rs.UBT1.R1	TGTATCTCAAGTGGCGGACG	CAGTCCACCTCGAATCTTCT
KCNQ3	refseq_KCNQ3.F1	refseq_KCNQ3.R1	TGTTGTGATGTGCTGCTCAT	GGCAGTGAACCAACTGATC	ZNF92	rs.ZNF92.F1	rs.ZNF92.R1	AAGAAGCTGGAGGTTCAAGCT	CCAAACATCTGGGCAAAATGAGA

ASEs contenant des VNTRs													
Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces		Gène	Noms d'amorces		Séquences d'amorces					
	Forward	Reverse	Forward	Reverse		Forward	Reverse	Forward	Reverse				
ABC2	ABC2.v1.F1	ABC2.v1.R1	TGGGATCATGAACCTGGTCTC	TGTACACGTAACCTGAATTACATTG	ANK2	ANK2.v1.F1	ANK2.v1.R1	TCGAAGCAAGTGTCCATCAGA	AGTTGGTGTCTGCTCCGTCTT				
BRD8	BRD8.v1.F1	BRD8.v1.R1	AACACAAGCTGCTAAGCACTGG	TTTTTGAGAGAACCAGTCTGGAGG	TBC1D3C	TBC1D3C.v1.F1	TBC1D3C.v1.R1	GCAGCGGGAACTACTCCACAT	AGTAGCCCACTCTCTGCAAGA				
DUSP22	DUSP22.v1.F1	DUSP22.v1.R1	ATGCCAGAGACGCGGAACAATT	AGGTTTGGAGATGGTGAATCCGC	ARPC18	ARPC18.v1.F1	ARPC18.v1.R1	AGTAACCGTATTGTGAACCTGG	ACACTGGAAGTACAGGAGCC				
EHMT1	EHMT1.v1.F1	EHMT1.v1.R1	AGGCTGACACCATGATCT	ACGACACAGTGTAGCGGTTCT	ENDOG	ENDOG.v1.F1	ENDOG.v1.R1	ACCAGAAATGCTGGAAACACT	ATGTTGGCAAAAGAGAGCC				
EW5R1	EW5R1.v1.F1	EW5R1.v1.R1	CTATTCTCTACACAGCCGACTAG	CCCGTAGCTGCTGCTCTGTT	ARHGEF16	ARHGEF16.v1.F1	ARHGEF16.v1.R1	AAGCGGCTGCAGGACAGAGCA	TGTCCACCTCATGTCTATCCA				
FRAP1	FRAP1.v1.F1	FRAP1.v1.R1	CAAATACCAAGGCAACAGCGA	GAAAGAAATGAATGATTCTGCACT	SQSTM1	SQSTM1.v1.F1	SQSTM1.v1.R1	AACAGTTTGGCGTGCAACATGG	AACCTCAACCTTGGAAAGACT				
POLE	POLE.v2.F1	POLE.v2.R1	GTGGGTGAAGAGGGACAGTTAC	CTCGTCGGGCTCATGGGAATA	BAX	BAX.v1.F1	BAX.v1.R1	TACTTTGCCAGCAAACTGGTGC	TTGAGCAATTCAGAGGCACTG				
RIN1	RIN1.v1.F1	RIN1.v1.R1	ACGTTCTCTGTGCGGAAATCTA	CGGGTGTGGCAGTAGGCACAGA	PAX8	PAX8.v1.F1	PAX8.v1.R1	CTCTACCCGCTGCGCTTGCTCA	CTGAGAGGAGGGGCTTGGC				
BAIAP2	BAIAP2.v1.F1	BAIAP2.v1.R1	ACCATATGGAGCAGTTCAACC	CGAGTCTTTGGAGCCCTGGCT	UG1	UG1.v1.F1	UG1.v1.R1	GGAGGCACTCCCGAAACGGA	TGGAGGTCTTTAGGGGCTTGG				
POLR2A	POLR2A.v1.F1	POLR2A.v1.R1	AGCCCGAACTATCTCCAGCA	TCGTGATGAGAAACGGATCCA	MAP3BP3	MAP3BP3.v1.F1	MAP3BP3.v1.R1	ATGATACAGACTACGTGGAGCA	CTGTGAGCTGGAGCTGACT				
KIF1A	KIF1A.v1.F1	KIF1A.v1.R1	AGCGACAAGGACATGCATGA	TTCACACAGAGCACATTGTCA	ADAM8	ADAM8.v1.F1	ADAM8.v1.R1	CCTCGGTCACTGTGTCCAG	CTCAGCTGACCAAGGTTGG				
COL4A2	COL4A2.v1.F1	COL4A2.v1.R1	AAGAGGTGGTGTGTCTGCTTT	TTCTCTGGCCCTCGAAGTACA	UIMC1	UIMC1.v1.F1	UIMC1.v1.R1	AAGTCGGGGGTGGTCCCTC	ACGCTTCTCTTCACTACAGCA				
SULF2	SULF2.v1.F1	SULF2.v1.R1	AGTACAAGGGCAGCTATGTCCG	TCGATGTGAGCTGTGTGCTCT	MAP2K7	MAP2K7.v1.F1	MAP2K7.v1.R1	TCTTCATCGCATGGAGGCTAT	GTTCTTGGCTTTGGAGTCCACCA				
NTHL1	NTHL1.v1.F1	NTHL1.v1.R1	AATACATCAAGCAGACAGCGC	TAGGCAGCACTCTCCAGG	POLD1	POLD1.v1.F1	POLD1.v1.R1	AGTCGAGGGGTACGGCGGGCTA	TGCAACCCCTCCAGGACTGA				
COL7A1	COL7A1andUCN2andPPKFB4.v1.F1	COL7A1andUCN2andPPKFB4.v1.R1	AAGCAAGAACAACCTCTGGCCA	ACACCACTGGGATCTCGCACA	MTMR15	MTMR15.v1.F1	MTMR15.v1.R1	TAGGGAGCAGGGAGAGTGGCT	TTGCTGAATCACTTTGGCAGG				
DOCK8	DOCK8.v1.F1	DOCK8.v1.R1	ACAACAAGAGGAGCTGAGCAA	TGTTCTTCACTCTCTGCG	HDAC6	HDAC6.v1.F1	HDAC6.v1.R1	AAGAAGGTCTGTGGAGCAGCA	TCCTGAGACTCCCAATGCTG				
KIAA1303	KIAA1303.v4.F1	KIAA1303.v4.R1	GACATCCCTACGGGCGAGACA	CTCACACTCAGATGTGGCCGT	ADAMTS2	ADAMTS2.v1.F1	ADAMTS2.v1.R1	AATGGAGGCCATGTAGCAGA	AGATGCCGAAGCTGTCTCC				
ITGA11	ITGA11.v1.F1	ITGA11.v1.R1	GCACCAACAAGAACGAGACT	CACCATGTTCTTGAGCTCT	GAK	GAK.v2.F1	GAK.v2.R1	CGGCATCTGTGCAAGTGAAC	CTTCCTGTAGCACTGCCA				
PDCD6	PDCD6.v1.F1	PDCD6.v1.R1	GGTCGATAAAGACAGAGTGAG	ATATGATGACCTGACAGTCACTG	TYK2	TYK2.v1.F1	TYK2.v1.R1	CCAGCAGATGATGATGCTGATA	TTCTTCCCAACAGGCTGCTT				
POLN	POLN.v1.F1	POLN.v1.R1	GCTCCGCTGTGACTCTGCA	CTGCACTCCCGGACTCTG	ENOX1	ENOX1.v1.F1	ENOX1.v1.R1	GCTGCCAGCATGATGCTGATT	CTCAAACTGCGAGCACTCA				
MAGED1	MAGED1.v1.F1	MAGED1.v1.R1	TGTTGAAGAGAACAGCAGTGG	TGGCCAAATCACTGGGTTCTG	NTS2	NTS2.v1.F1	NTS2.v1.R1	GATTGTGCGGTGCGCTGGA	CCAGAACTTTGGAGGCCGA				
ELN	ELN.v3.F1	ELN.v3.R1	CTGCAGCTGGGCTTGGTCT	CATATTGGCTGCTTAGCGGC									

Tableau supplémentaire 1: Liste d'amorces pour réactions RT-PCR. Liste d'amorces RT-PCR employées dans le chapitre III pour les 192 ASEs classiques (RNPS1), les 116 ASEs classiques liées par TDP-43 et les 43 ASEs contenant des VNTRs.

Licences d'utilisation des figures provenant de publications

Figure 1: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 2: Licence # 4107270204538 obtenue le 13 mai 2017 (Turunen 2013)

Figure 3: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 4: Licence # 4111540041253 obtenue le 17 mai 2017 (Ast 2004)

Figure 5: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 6: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 7: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 8: Licence # 4111540265018 obtenue le 17 mai 2017 (Aguilera 2005)

Figure 9: Licence # 4107271493825 obtenue le 13 mai 2017 (Aguilera 2012)

Figure 10: Licence # 4107280233176 obtenue le 13 mai 2017 (Aguilera 2012)

Figure 11: Licence # 4111560418901 obtenue le 17 mai 2017 (Keren 2010)

Figure 12: Licence # 4107280509333 obtenue le 13 mai 2017 (Schwerk 2005)

Figure 13: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 14: Licence # 4107311436193 obtenue le 13 mai 2017 (Schwerk 2005)

Figure 15: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 16: Aucune licence d'utilisation requise.

Figure 17: Aucune licence d'utilisation requise.

Tableau 1: Aucune licence d'utilisation requise.

Chapitre III : figure 2 : Licence # 4111540265018 obtenue le 17 mai 2017 (Aguilera 2005)

LISTE DES RÉFÉRENCES

- (2005). "A haplotype map of the human genome." *Nature* **437**(7063): 1299-1320.
- Aaltonen, V., J. Koivunen, et al. (2006). "Heterogeneity of cellular proliferation within transitional cell carcinoma: correlation of protein kinase C alpha/betaI expression and activity." *J Histochem Cytochem* **54**(7): 795-806.
- Adams, J. M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." *Genes Dev* **17**(20): 2481-2495.
- Aguilera, A. (2005). "mRNA processing and genomic instability." *Nat Struct Mol Biol* **12**(9): 737-738.
- Aguilera, A. and T. Garcia-Muse (2012). "R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability." *Mol Cell* **46**(2): 115-124.
- Aguilera, A. and B. Gomez-Gonzalez (2008). "Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences." *Nat Rev Genet* **9**(3): 204-217.
- Akaike, Y., K. Masuda, et al. (2014). "HuR regulates alternative splicing of the TRA2beta gene in human colon cancer cells under oxidative stress." *Mol Cell Biol* **34**(15): 2857-2873.
- Allemand, E., S. Guil, et al. (2005). "Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3605-3610.
- Almeida, L. O., C. B. Garcia, et al. (2014). "Accumulated SET protein up-regulates and interacts with hnRNPK, increasing its binding to nucleic acids, the Bcl-xS repression, and cellular proliferation." *Biochem Biophys Res Commun* **445**(1): 196-202.
- Alt, F. W., A. L. Bothwell, et al. (1980). "Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends." *Cell* **20**(2): 293-301.
- Amrein, H., M. Gorman, et al. (1988). "The sex-determining gene tra-2 of Drosophila encodes a putative RNA binding protein." *Cell* **55**(6): 1025-1035.
- Amrein, H., M. L. Hedley, et al. (1994). "The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2." *Cell* **76**(4): 735-746.
- Amundson, S. A., T. G. Myers, et al. (2000). "An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines." *Cancer Res* **60**(21): 6101-6110.
- Anderton, R. S., L. L. Price, et al. (2012). "Co-regulation of survival of motor neuron and Bcl-xL expression: implications for neuroprotection in spinal muscular atrophy." *Neuroscience* **220**: 228-236.
- Andres, A. M., M. Y. Dennis, et al. (2010). "Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation." *PLoS Genet* **6**(10): e1001157.
- Apostolatos, A., S. Song, et al. (2012). "Insulin promotes neuronal survival via the alternatively spliced protein kinase CdeltaII isoform." *J Biol Chem* **287**(12): 9299-9310.
- Arnold, E. S., S. C. Ling, et al. (2013). "ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(8): E736-745.

- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 420-430.
- Asimaki, O. and D. Mangoura (2011). "Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKCepsilon, Src, and Fyn in primary neurons." *Neurochem Int* **58**(2): 135-144.
- Ast, G. (2004). "How did alternative splicing evolve?" *Nat Rev Genet* **5**(10): 773-782.
- Auboeuf, D., A. Honig, et al. (2002). "Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators." *Science* **298**(5592): 416-419.
- Ayala, Y. M., T. Misteli, et al. (2008). "TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(10): 3785-3789.
- Bagga, P. S., G. K. Arhin, et al. (1998). "DSEF-1 is a member of the hnRNP H family of RNA-binding proteins and stimulates pre-mRNA cleavage and polyadenylation in vitro." *Nucleic Acids Res* **26**(23): 5343-5350.
- Bakhshi, A., J. P. Jensen, et al. (1985). "Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18." *Cell* **41**(3): 899-906.
- Ban, J., L. Eckhart, et al. (1998). "Identification of a human cDNA encoding a novel Bcl-x isoform." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(1): 147-152.
- Barbas, J. A., J. Galceran, et al. (1993). "Abnormal muscle development in the heldup3 mutant of *Drosophila melanogaster* is caused by a splicing defect affecting selected troponin I isoforms." *Mol Cell Biol* **13**(3): 1433-1439.
- Barbier, J., M. Dutertre, et al. (2007). "Regulation of H-ras splice variant expression by cross talk between the p53 and nonsense-mediated mRNA decay pathways." *Mol Cell Biol* **27**(20): 7315-7333.
- Barbour, S. E., P. T. Nguyen, et al. (2015). "Group VIA Phospholipase A2 (iPLA2beta) Modulates Bcl-x 5'-Splice Site Selection and Suppresses Anti-apoptotic Bcl-x(L) in beta-Cells." *J Biol Chem* **290**(17): 11021-11031.
- Barrass, J. D. and J. D. Beggs (2003). "Splicing goes global." *Trends Genet* **19**(6): 295-298.
- Batsche, E., M. Yaniv, et al. (2006). "The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing." *Nat Struct Mol Biol* **13**(1): 22-29.
- Bell, L. R., E. M. Maine, et al. (1988). "Sex-lethal, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins." *Cell* **55**(6): 1037-1046.
- Bellare, P., E. C. Small, et al. (2008). "A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway." *Nat Struct Mol Biol* **15**(5): 444-451.
- Benedict, M. A., Y. Hu, et al. (2000). "Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9." *J Biol Chem* **275**(12): 8461-8468.
- Bentley, D. L. (2005). "Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors." *Curr Opin Cell Biol* **17**(3): 251-256.
- Berget, S. M. (1995). "Exon recognition in vertebrate splicing." *J Biol Chem* **270**(6): 2411-2414.
- Berget, S. M., C. Moore, et al. (1977). "Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(8): 3171-3175.
- Bevilacqua, E., X. Wang, et al. (2010). "eIF2alpha phosphorylation tips the balance to apoptosis during osmotic stress." *J Biol Chem* **285**(22): 17098-17111.

- Beyer, A. L. and Y. N. Osheim (1988). "Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts." *Genes Dev* **2**(6): 754-765.
- Bhatia, V., S. I. Barroso, et al. (2014). "BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2." *Nature* **511**(7509): 362-365.
- Biamonti, G., M. T. Bassi, et al. (1993). "Human hnRNP protein A1 gene expression. Structural and functional characterization of the promoter." *J Mol Biol* **230**(1): 77-89.
- Biamonti, G., M. Buvoli, et al. (1989). "Isolation of an active gene encoding human hnRNP protein A1. Evidence for alternative splicing." *J Mol Biol* **207**(3): 491-503.
- Bianchini, R., G. Nocentini, et al. (2006). "Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment." *J Pharmacol Exp Ther* **319**(2): 887-897.
- Bielli, P., M. Bordi, et al. (2014). "Regulation of BCL-X splicing reveals a role for the polypyrimidine tract binding protein (PTBP1/hnRNP I) in alternative 5' splice site selection." *Nucleic Acids Res* **42**(19): 12070-12081.
- Bielli, P., R. Busa, et al. (2014). "The transcription factor FBI-1 inhibits SAM68-mediated BCL-X alternative splicing and apoptosis." *EMBO Rep* **15**(4): 419-427.
- Black, D. L. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." *Annu Rev Biochem* **72**: 291-336.
- Blanchette, M. and B. Chabot (1997). "A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B." *RNA* **3**(4): 405-419.
- Blanchette, M. and B. Chabot (1999). "Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization." *EMBO J* **18**(7): 1939-1952.
- Blasius, M., S. A. Wagner, et al. (2014). "A quantitative 14-3-3 interaction screen connects the nuclear exosome targeting complex to the DNA damage response." *Genes Dev* **28**(18): 1977-1982.
- Boggs, R. T., P. Gregor, et al. (1987). "Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene." *Cell* **50**(5): 739-747.
- Bois, P. and A. J. Jeffreys (1999). "Minisatellite instability and germline mutation." *Cell Mol Life Sci* **55**(12): 1636-1648.
- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." *Cell* **74**(4): 597-608.
- Boon-Unge, K., Q. Yu, et al. (2007). "Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism." *Chem Biol* **14**(12): 1386-1392.
- Bordeleau, F., J. P. Califano, et al. (2015). "Tissue stiffness regulates serine/arginine-rich protein-mediated splicing of the extra domain B-fibronectin isoform in tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(27): 8314-8319.
- Boule, J. B. and V. A. Zakian (2007). "The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA DNA substrates." *Nucleic Acids Res* **35**(17): 5809-5818.
- Bourbon, N. A., J. Yun, et al. (2001). "Inhibitory actions of ceramide upon PKC-epsilon/ERK interactions." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(6): C1403-1411.
- Bransteitter, R., P. Pham, et al. (2003). "Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 4102-4107.

- Brennan, G. P., E. M. Jimenez-Mateos, et al. (2013). "Transgenic overexpression of 14-3-3 zeta protects hippocampus against endoplasmic reticulum stress and status epilepticus in vivo." *PLoS One* **8**(1): e54491.
- Brignatz, C., M. P. Paronetto, et al. (2009). "Alternative splicing modulates autoinhibition and SH3 accessibility in the Src kinase Fyn." *Mol Cell Biol* **29**(24): 6438-6448.
- Broccoli, S., F. Rallu, et al. (2004). "Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation." *Mol Microbiol* **52**(6): 1769-1779.
- Brodsky, A. S., C. A. Meyer, et al. (2005). "Genomic mapping of RNA polymerase II reveals sites of co-transcriptional regulation in human cells." *Genome Biol* **6**(8): R64.
- Buckanovich, R. J., J. B. Posner, et al. (1993). "Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system." *Neuron* **11**(4): 657-672.
- Buratti, E., M. Baralle, et al. (2004). "hnRNP H binding at the 5' splice site correlates with the pathological effect of two intronic mutations in the NF-1 and TSHbeta genes." *Nucleic Acids Res* **32**(14): 4224-4236.
- Buratti, E., A. Brindisi, et al. (2004). "Nuclear factor TDP-43 binds to the polymorphic TG repeats in CFTR intron 8 and causes skipping of exon 9: a functional link with disease penetrance." *Am J Hum Genet* **74**(6): 1322-1325.
- Buratti, E., A. Dhir, et al. (2007). "RNA structure is a key regulatory element in pathological ATM and CFTR pseudoexon inclusion events." *Nucleic Acids Res* **35**(13): 4369-4383.
- Buratti, E., T. Dork, et al. (2001). "Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping." *EMBO J* **20**(7): 1774-1784.
- Burd, C. G. and G. Dreyfuss (1994). "RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing." *EMBO J* **13**(5): 1197-1204.
- Bureau, F., A. Vanderplasschen, et al. (2002). "Constitutive nuclear factor-kappaB activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins." *Blood* **99**(10): 3683-3691.
- Burge, C. B., R. A. Padgett, et al. (1998). "Evolutionary fates and origins of U12-type introns." *Mol Cell* **2**(6): 773-785.
- Burns, M. B., L. Lackey, et al. (2013). "APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer." *Nature* **494**(7437): 366-370.
- Burns, M. B., N. A. Temiz, et al. (2013). "Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers." *Nat Genet* **45**(9): 977-983.
- Busa, R., R. Geremia, et al. (2010). "Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin." *Nucleic Acids Res* **38**(9): 3005-3018.
- Busa, R., M. P. Paronetto, et al. (2007). "The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells." *Oncogene* **26**(30): 4372-4382.
- Buvoli, M., F. Cobianchi, et al. (1990). "Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein." *EMBO J* **9**(4): 1229-1235.

- Cabodi, S., E. Calautti, et al. (2000). "A PKC- η /Fyn-dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation." *Mol Cell* **6**(5): 1121-1129.
- Calarco, J. A., S. Superina, et al. (2009). "Regulation of vertebrate nervous system alternative splicing and development by an SR-related protein." *Cell* **138**(5): 898-910.
- Cannons, J. L., L. J. Yu, et al. (2004). "SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC- θ -mediated activation of NF- κ B1." *Immunity* **21**(5): 693-706.
- Cardinali, B., P. T. Cohen, et al. (1994). "Protein phosphatase 1 can modulate alternative 5' splice site selection in a HeLa splicing extract." *FEBS Lett* **352**(3): 276-280.
- Cartegni, L., M. L. Hastings, et al. (2006). "Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2." *Am J Hum Genet* **78**(1): 63-77.
- Cartegni, L. and A. R. Krainer (2002). "Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1." *Nat Genet* **30**(4): 377-384.
- Cascino, I., G. Fiucci, et al. (1995). "Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing." *J Immunol* **154**(6): 2706-2713.
- Cascino, I., G. Papoff, et al. (1996). "Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis." *J Immunol* **156**(1): 13-17.
- Casciola-Rosen, L. A., D. K. Miller, et al. (1994). "Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death." *J Biol Chem* **269**(49): 30757-30760.
- Castellano-Pozo, M., T. Garcia-Muse, et al. (2012). "R-loops cause replication impairment and genome instability during meiosis." *EMBO Rep* **13**(10): 923-929.
- Castellano-Pozo, M., J. M. Santos-Pereira, et al. (2013). "R loops are linked to histone H3 S10 phosphorylation and chromatin condensation." *Mol Cell* **52**(4): 583-590.
- Castello, A., B. Fischer, et al. (2012). "Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins." *Cell* **149**(6): 1393-1406.
- Cerritelli, S. M. and R. J. Crouch (2009). "Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes." *FEBS J* **276**(6): 1494-1505.
- Chabot, B., S. Bisotto, et al. (1995). "The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle." *Nucleic Acids Res* **23**(16): 3206-3213.
- Chabot, B., M. Blanchette, et al. (1997). "An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1." *Mol Cell Biol* **17**(4): 1776-1786.
- Chakraborty, P. and F. Grosse (2011). "Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes." *DNA Repair (Amst)* **10**(6): 654-665.
- Chalfant, C. E., K. Kishikawa, et al. (1999). "Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid." *J Biol Chem* **274**(29): 20313-20317.
- Chalfant, C. E., B. Ogretmen, et al. (2001). "FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1." *J Biol Chem* **276**(48): 44848-44855.

- Chalfant, C. E., K. Rathman, et al. (2002). "De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1." *J Biol Chem* **277**(15): 12587-12595.
- Chang, B. S., A. Kelekar, et al. (1999). "The BH3 domain of Bcl-x(S) is required for inhibition of the antiapoptotic function of Bcl-x(L)." *Mol Cell Biol* **19**(10): 6673-6681.
- Chang, J. G., D. M. Yang, et al. (2011). "Small molecule amiloride modulates oncogenic RNA alternative splicing to devitalize human cancer cells." *PLoS One* **6**(6): e18643.
- Chang, W. H., T. C. Liu, et al. (2011). "Amiloride modulates alternative splicing in leukemic cells and resensitizes Bcr-AblT315I mutant cells to imatinib." *Cancer Res* **71**(2): 383-392.
- Charpentier, B. and M. Rosbash (1996). "Intramolecular structure in yeast introns aids the early steps of in vitro spliceosome assembly." *RNA* **2**(6): 509-522.
- Chaudhuri, J., C. Khuong, et al. (2004). "Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets." *Nature* **430**(7003): 992-998.
- Chavez, S. and A. Aguilera (1997). "The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability." *Genes Dev* **11**(24): 3459-3470.
- Chavez, S., T. Beilharz, et al. (2000). "A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* **19**(21): 5824-5834.
- Chavez, S., M. Garcia-Rubio, et al. (2001). "Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **21**(20): 7054-7064.
- Chen, Y. and W. Stephan (2003). "Compensatory evolution of a precursor messenger RNA secondary structure in the *Drosophila melanogaster* Adh gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11499-11504.
- Chen, Z. Y., L. Cai, et al. (2011). "Fyn requires HnRNPA2B1 and Sam68 to synergistically regulate apoptosis in pancreatic cancer." *Carcinogenesis* **32**(10): 1419-1426.
- Cheng, J., C. Liu, et al. (1995). "Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region." *J Immunol* **154**(3): 1239-1245.
- Cheng, J., T. Zhou, et al. (1994). "Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule." *Science* **263**(5154): 1759-1762.
- Chou, M. Y., J. G. Underwood, et al. (2000). "Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing." *Mol Cell* **5**(6): 949-957.
- Chow, L. T., R. E. Gelinas, et al. (1977). "An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA." *Cell* **12**(1): 1-8.
- Churchman, L. S. and J. S. Weissman (2011). "Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution." *Nature* **469**(7330): 368-373.
- Clarke, M. F., I. J. Apel, et al. (1995). "A recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11024-11028.
- Cloutier, P., J. Toutant, et al. (2008). "Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x." *J Biol Chem* **283**(31): 21315-21324.

- Colombrita, C., E. Onesto, et al. (2012). "TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells." *J Biol Chem* **287**(19): 15635-15647.
- Colwill, K., T. Pawson, et al. (1996). "The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution." *EMBO J* **15**(2): 265-275.
- Comiskey, D. F., Jr., A. G. Jacob, et al. (2015). "Splicing factor SRSF1 negatively regulates alternative splicing of MDM2 under damage." *Nucleic Acids Res* **43**(8): 4202-4218.
- Cooke, M. P. and R. M. Perlmutter (1989). "Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells." *New Biol* **1**(1): 66-74.
- Cooper, T. A., L. Wan, et al. (2009). "RNA and disease." *Cell* **136**(4): 777-793.
- Coulombe-Huntington, J., K. C. Lam, et al. (2009). "Fine-scale variation and genetic determinants of alternative splicing across individuals." *PLoS Genet* **5**(12): e1000766.
- Courteau, L., J. Crasto, et al. (2015). "Hexokinase 2 controls cellular stress response through localization of an RNA-binding protein." *Cell Death Dis* **6**: e1837.
- Cramer, P., J. F. Caceres, et al. (1999). "Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer." *Mol Cell* **4**(2): 251-258.
- Cramer, P., C. G. Pesce, et al. (1997). "Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11456-11460.
- Crosby, D. and A. W. Poole (2003). "Physical and functional interaction between protein kinase C delta and Fyn tyrosine kinase in human platelets." *J Biol Chem* **278**(27): 24533-24541.
- Cui, L., P. K. Wall, et al. (2006). "Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants." *Genome Res* **16**(6): 738-749.
- Dallaire, F., S. Dupuis, et al. (2000). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro." *J Biol Chem* **275**(19): 14509-14516.
- Damianov, A., Y. Ying, et al. (2016). "Rbfox Proteins Regulate Splicing as Part of a Large Multiprotein Complex LASR." *Cell* **165**(3): 606-619.
- Das, R., J. Yu, et al. (2007). "SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing." *Mol Cell* **26**(6): 867-881.
- Davies, R. C., C. Calvio, et al. (1998). "WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes." *Genes Dev* **12**(20): 3217-3225.
- de Almeida, S. F., A. R. Grosso, et al. (2011). "Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36." *Nat Struct Mol Biol* **18**(9): 977-983.
- de Chiara, C., R. P. Menon, et al. (2009). "Phosphorylation of S776 and 14-3-3 binding modulate ataxin-1 interaction with splicing factors." *PLoS One* **4**(12): e8372.
- de la Mata, M., C. R. Alonso, et al. (2003). "A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo." *Mol Cell* **12**(2): 525-532.
- de la Mata, M. and A. R. Kornblihtt (2006). "RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20." *Nat Struct Mol Biol* **13**(11): 973-980.

- Denning, M. F., A. A. Dlugosz, et al. (1996). "Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta." *J Biol Chem* **271**(10): 5325-5331.
- Di Noia, J. M. and M. S. Neuberger (2007). "Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation." *Annu Rev Biochem* **76**: 1-22.
- Diaz-Moreno, I., D. Hollingworth, et al. (2009). "Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding." *Nat Struct Mol Biol* **16**(3): 238-246.
- Djebali, S., C. A. Davis, et al. (2012). "Landscape of transcription in human cells." *Nature* **489**(7414): 101-108.
- Dominguez-Sanchez, M. S., S. Barroso, et al. (2011). "Genome instability and transcription elongation impairment in human cells depleted of THO/TREX." *PLoS Genet* **7**(12): e1002386.
- Dominguez, C., J. F. Fisette, et al. (2010). "Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs." *Nat Struct Mol Biol* **17**(7): 853-861.
- Donahue, C. P., C. Muratore, et al. (2006). "Stabilization of the tau exon 10 stem loop alters pre-mRNA splicing." *J Biol Chem* **281**(33): 23302-23306.
- Downward, J., J. D. Graves, et al. (1990). "Stimulation of p21ras upon T-cell activation." *Nature* **346**(6286): 719-723.
- Dreyfuss, G., M. J. Matunis, et al. (1993). "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA." *Annu Rev Biochem* **62**: 289-321.
- Drolet, M., X. Bi, et al. (1994). "Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro." *J Biol Chem* **269**(3): 2068-2074.
- Drolet, M., S. Broccoli, et al. (2003). "The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription." *Front Biosci* **8**: d210-221.
- Duquette, M. L., P. Handa, et al. (2004). "Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA." *Genes Dev* **18**(13): 1618-1629.
- Dutertre, M., G. Sanchez, et al. (2010). "Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response." *Nat Struct Mol Biol* **17**(11): 1358-1366.
- Dye, M. J., N. Gromak, et al. (2006). "Exon tethering in transcription by RNA polymerase II." *Mol Cell* **21**(6): 849-859.
- Early, P., J. Rogers, et al. (1980). "Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways." *Cell* **20**(2): 313-319.
- Edmond, V., E. Moysan, et al. (2011). "Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin." *EMBO J* **30**(3): 510-523.
- Eickbush, T. (1999). "Exon shuffling in retrospect." *Science* **283**(5407): 1465;1467.
- Emanuele, S., M. Lauricella, et al. (2007). "SAHA induces apoptosis in hepatoma cells and synergistically interacts with the proteasome inhibitor Bortezomib." *Apoptosis* **12**(7): 1327-1338.
- Erkelenz, S., W. F. Mueller, et al. (2013). "Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms." *RNA* **19**(1): 96-102.
- Fan, H. Y., R. J. Merker, et al. (2001). "High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses hpr1-mediated genomic instability." *Mol Cell Biol* **21**(16): 5459-5470.

- Fang, W., J. J. Rivard, et al. (1994). "Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B and T lymphocytes." *J Immunol* **153**(10): 4388-4398.
- Fiset, S. and B. Chabot (2001). "hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro." *Nucleic Acids Res* **29**(11): 2268-2275.
- Fisette, J. F., J. Toutant, et al. (2010). "hnRNP A1 and hnRNP H can collaborate to modulate 5' splice site selection." *RNA* **16**(1): 228-238.
- Fox-Walsh, K. L., Y. Dou, et al. (2005). "The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(45): 16176-16181.
- Frederico, L. A., T. A. Kunkel, et al. (1990). "A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy." *Biochemistry* **29**(10): 2532-2537.
- Fu, D. and K. Collins (2007). "Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation." *Mol Cell* **28**(5): 773-785.
- Fu, W., T. D. O'Connor, et al. (2013). "Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants." *Nature* **493**(7431): 216-220.
- Fu, X. D. and T. Maniatis (1992). "The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1725-1729.
- Fuchs, Y. and H. Steller (2011). "Programmed cell death in animal development and disease." *Cell* **147**(4): 742-758.
- Fuchs, Y. and H. Steller (2015). "Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(6): 329-344.
- Fujioka, S., C. Schmidt, et al. (2004). "Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-kappaB." *J Biol Chem* **279**(26): 27549-27559.
- Fumagalli, S., N. F. Totty, et al. (1994). "A target for Src in mitosis." *Nature* **368**(6474): 871-874.
- Gallego, M. E., R. Gattoni, et al. (1997). "The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A." *EMBO J* **16**(7): 1772-1784.
- Gan, W., Z. Guan, et al. (2011). "R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression." *Genes Dev* **25**(19): 2041-2056.
- Gardina, P. J., T. A. Clark, et al. (2006). "Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array." *BMC Genomics* **7**: 325.
- Garneau, D., T. Revil, et al. (2005). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x." *J Biol Chem* **280**(24): 22641-22650.
- Ge, H. and J. L. Manley (1990). "A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro." *Cell* **62**(1): 25-34.
- Ge, H., Y. Si, et al. (1998). "A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2." *Mol Cell* **2**(6): 751-759.
- Ge, H., P. Zuo, et al. (1991). "Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators." *Cell* **66**(2): 373-382.

- Gellert, M., K. Mizuuchi, et al. (1976). "DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(11): 3872-3876.
- Ghigna, C., S. Giordano, et al. (2005). "Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene." *Mol Cell* **20**(6): 881-890.
- Gilbert, W. (1978). "Why genes in pieces?" *Nature* **271**(5645): 501.
- Ginno, P. A., P. L. Lott, et al. (2012). "R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters." *Mol Cell* **45**(6): 814-825.
- Girard, C., C. L. Will, et al. (2012). "Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion." *Nat Commun* **3**: 994.
- Gomez-Gonzalez, B. and A. Aguilera (2007). "Activation-induced cytidine deaminase action is strongly stimulated by mutations of the THO complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(20): 8409-8414.
- Gonzalez-Garcia, M., I. Garcia, et al. (1995). "bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4304-4308.
- Gonzalez-Garcia, M., R. Perez-Ballester, et al. (1994). "bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria." *Development* **120**(10): 3033-3042.
- Graveley, B. R. (2005). "Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures." *Cell* **123**(1): 65-73.
- Green, P., B. Ewing, et al. (2003). "Transcription-associated mutational asymmetry in mammalian evolution." *Nat Genet* **33**(4): 514-517.
- Grillot, D. A., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1997). "Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene." *J Immunol* **158**(10): 4750-4757.
- Grosso, A. R., S. Martins, et al. (2008). "The emerging role of splicing factors in cancer." *EMBO Rep* **9**(11): 1087-1093.
- Gschwendt, M., K. Kielbassa, et al. (1994). "Tyrosine phosphorylation and stimulation of protein kinase C delta from porcine spleen by src in vitro. Dependence on the activated state of protein kinase C delta." *FEBS Lett* **347**(1): 85-89.
- Gu, W. J. and H. L. Liu (2013). "Induction of pancreatic cancer cell apoptosis, invasion, migration, and enhancement of chemotherapy sensitivity of gemcitabine, 5-FU, and oxaliplatin by hnRNP A2/B1 siRNA." *Anticancer Drugs* **24**(6): 566-576.
- Gui, J. F., W. S. Lane, et al. (1994). "A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle." *Nature* **369**(6482): 678-682.
- Guil, S., J. C. Long, et al. (2006). "hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response." *Mol Cell Biol* **26**(15): 5744-5758.
- Hall, M. P., R. J. Nagel, et al. (2013). "Quaking and PTB control overlapping splicing regulatory networks during muscle cell differentiation." *RNA* **19**(5): 627-638.
- Hallier, M., A. Lerga, et al. (1998). "The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS." *J Biol Chem* **273**(9): 4838-4842.
- Harris, R. S., S. K. Petersen-Mahrt, et al. (2002). "RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators." *Mol Cell* **10**(5): 1247-1253.
- Hegde, M. L., S. Banerjee, et al. (2012). "Enhancement of NEIL1 protein-initiated oxidized DNA base excision repair by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP-U) via direct interaction." *J Biol Chem* **287**(41): 34202-34211.

- Heinzen, E. L., W. Yoon, et al. (2007). "Nova2 interacts with a cis-acting polymorphism to influence the proportions of drug-responsive splice variants of SCN1A." Am J Hum Genet **80**(5): 876-883.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.
- Hermeking, H., C. Lengauer, et al. (1997). "14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression." Mol Cell **1**(1): 3-11.
- Higa-Nakamine, S., N. Maeda, et al. (2015). "Involvement of Protein Kinase D1 in Signal Transduction from the Protein Kinase C Pathway to the Tyrosine Kinase Pathway in Response to Gonadotropin-releasing Hormone." J Biol Chem **290**(43): 25974-25985.
- Hiller, M., Z. Zhang, et al. (2007). "Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition." PLoS Genet **3**(11): e204.
- Hofmann, J. C., J. Tegha-Dunghu, et al. (2013). "The Prp19 complex directly functions in mitotic spindle assembly." PLoS One **8**(9): e74851.
- Honda, D., S. Ishigaki, et al. (2013). "The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons." FEBS Open Bio **4**: 1-10.
- Hong, Y., S. W. Jang, et al. (2011). "The N-terminal fragment from caspase-cleaved serine/arginine protein-specific kinase2 (SRPK2) translocates into the nucleus and promotes apoptosis." J Biol Chem **286**(1): 777-786.
- Hoskins, A. A., L. J. Friedman, et al. (2011). "Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes." Science **331**(6022): 1289-1295.
- Hossini, A. M., C. C. Geilen, et al. (2006). "A novel Bcl-x splice product, Bcl-xAK, triggers apoptosis in human melanoma cells without BH3 domain." Oncogene **25**(15): 2160-2169.
- House, A. E. and K. W. Lynch (2006). "An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition." Nat Struct Mol Biol **13**(10): 937-944.
- Hsu, K. L., H. J. Fan, et al. (2009). "Protein kinase C-Fyn kinase cascade mediates the oleic acid-induced disassembly of neonatal rat cardiomyocyte adherens junctions." Int J Biochem Cell Biol **41**(7): 1536-1546.
- Hu, Z., A. Zhang, et al. (2006). "An antibody-based microarray assay for small RNA detection." Nucleic Acids Res **34**(7): e52.
- Huang, Y. and J. A. Steitz (2001). "Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA." Mol Cell **7**(4): 899-905.
- Huertas, P. and A. Aguilera (2003). "Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination." Mol Cell **12**(3): 711-721.
- Hull, J., S. Campino, et al. (2007). "Identification of common genetic variation that modulates alternative splicing." PLoS Genet **3**(6): e99.
- Huvet, M., S. Nicolay, et al. (2007). "Human gene organization driven by the coordination of replication and transcription." Genome Res **17**(9): 1278-1285.
- Idriss, H., A. Kumar, et al. (1994). "Regulation of in vitro nucleic acid strand annealing activity of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein A1 by reversible phosphorylation." Biochemistry **33**(37): 11382-11390.

- Iervolino, A., G. Santilli, et al. (2002). "hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis." Mol Cell Biol **22**(7): 2255-2266.
- Inoue, A., N. Yamamoto, et al. (2014). "RBM10 regulates alternative splicing." FEBS Lett **588**(6): 942-947.
- Ip, J. Y., D. Schmidt, et al. (2011). "Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation." Genome Res **21**(3): 390-401.
- Itoh, T. and J. Tomizawa (1980). "Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2450-2454.
- Izquierdo, J. M., N. Majos, et al. (2005). "Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition." Mol Cell **19**(4): 475-484.
- Izquierdo, J. M. and J. Valcarcel (2006). "A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing." Genes Dev **20**(13): 1679-1684.
- Jackson, B. R., M. Noerenberg, et al. (2014). "A novel mechanism inducing genome instability in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infected cells." PLoS Pathog **10**(5): e1004098.
- Jeffreys, A. J., R. Barber, et al. (1999). "Human minisatellites, repeat DNA instability and meiotic recombination." Electrophoresis **20**(8): 1665-1675.
- Jeffreys, A. J., P. Bois, et al. (1997). "Spontaneous and induced minisatellite instability." Electrophoresis **18**(9): 1501-1511.
- Jeffreys, A. J. and R. Neumann (1997). "Somatic mutation processes at a human minisatellite." Hum Mol Genet **6**(1): 129-132; 134-126.
- Jeffreys, A. J., N. J. Royle, et al. (1988). "Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA." Nature **332**(6161): 278-281.
- Jensen, K. B., B. K. Dredge, et al. (2000). "Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability." Neuron **25**(2): 359-371.
- Ji, X., Y. Zhou, et al. (2013). "SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase." Cell **153**(4): 855-868.
- Jiang, Z. H., W. J. Zhang, et al. (1998). "Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9155-9160.
- Jimeno, S., A. G. Rondon, et al. (2002). "The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability." EMBO J **21**(13): 3526-3535.
- Jin, Y., H. Suzuki, et al. (2003). "A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG." EMBO J **22**(4): 905-912.
- Jones, R. B., F. Wang, et al. (2001). "The nonsense-mediated decay pathway and mutually exclusive expression of alternatively spliced FGFR2IIIb and -IIIC mRNAs." J Biol Chem **276**(6): 4158-4167.
- Joseloff, E., C. Cataisson, et al. (2002). "Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes." J Biol Chem **277**(14): 12318-12323.
- Jumaa, H., J. L. Guenet, et al. (1997). "Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle." Mol Cell Biol **17**(6): 3116-3124.

- Jumaa, H. and P. J. Nielsen (1997). "The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation." *EMBO J* **16**(16): 5077-5085.
- Kajimoto, T., S. Ohmori, et al. (2001). "Subtype-specific translocation of the delta subtype of protein kinase C and its activation by tyrosine phosphorylation induced by ceramide in HeLa cells." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1769-1783.
- Kamachi, M., T. M. Le, et al. (2002). "Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway." *J Exp Med* **196**(9): 1213-1225.
- Kanopka, A., O. Muhlemann, et al. (1996). "Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA." *Nature* **381**(6582): 535-538.
- Karni, R., E. de Stanchina, et al. (2007). "The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene." *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 185-193.
- Kashima, T. and J. L. Manley (2003). "A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy." *Nat Genet* **34**(4): 460-463.
- Kashima, T., N. Rao, et al. (2007). "hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing." *Hum Mol Genet* **16**(24): 3149-3159.
- Katzenberger, R. J., M. S. Marengo, et al. (2009). "Control of alternative splicing by signal-dependent degradation of splicing-regulatory proteins." *J Biol Chem* **284**(16): 10737-10746.
- Keren, H., G. Lev-Maor, et al. (2010). "Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function." *Nat Rev Genet* **11**(5): 345-355.
- Kiledjian, M., C. T. DeMaria, et al. (1997). "Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex." *Mol Cell Biol* **17**(8): 4870-4876.
- Kim, H. D., J. Choe, et al. (1999). "The sen1(+) gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast SEN1, encodes an RNA and DNA helicase." *Biochemistry* **38**(44): 14697-14710.
- Kim, M. H. (2008). "Protein phosphatase 1 activation and alternative splicing of Bcl-X and Mcl-1 by EGCG + ibuprofen." *J Cell Biochem* **104**(4): 1491-1499.
- Kinoshita, T., M. Matsubara, et al. (2006). "Structure of human Fyn kinase domain complexed with staurosporine." *Biochem Biophys Res Commun* **346**(3): 840-844.
- Kissler, S., L. Lu, et al. (2004). "Thymic selection can compensate for mutations affecting T cell activation and generate a normal T cell repertoire in mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 210-214.
- Klinck, R., A. Bramard, et al. (2008). "Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer." *Cancer Res* **68**(3): 657-663.
- Kohn, K. W., B. M. Zeeberg, et al. (2014). "Gene expression correlations in human cancer cell lines define molecular interaction networks for epithelial phenotype." *PLoS One* **9**(6): e99269.
- Kohtz, J. D., S. F. Jamison, et al. (1994). "Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors." *Nature* **368**(6467): 119-124.
- Kondrashov, F. A. and E. V. Koonin (2001). "Origin of alternative splicing by tandem exon duplication." *Hum Mol Genet* **10**(23): 2661-2669.
- Koonin, E. V. and Y. I. Wolf (2010). "Constraints and plasticity in genome and molecular-phenome evolution." *Nat Rev Genet* **11**(7): 487-498.
- Koralewski, T. E. and K. V. Krutovsky (2011). "Evolution of exon-intron structure and alternative splicing." *PLoS One* **6**(3): e18055.

- Kornblihtt, A. R. (2006). "Chromatin, transcript elongation and alternative splicing." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 5-7.
- Kornblihtt, A. R. (2007). "Coupling transcription and alternative splicing." Adv Exp Med Biol **623**: 175-189.
- Koumbadinga, G. A., N. Mahmood, et al. (2015). "Increased stability of heterogeneous ribonucleoproteins by a deacetylase inhibitor." Biochim Biophys Acta **1849**(8): 1095-1103.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Krainer, A. R., G. C. Conway, et al. (1990). "The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites." Cell **62**(1): 35-42.
- Krainer, A. R., G. C. Conway, et al. (1990). "Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells." Genes Dev **4**(7): 1158-1171.
- Krainer, A. R. and T. Maniatis (1985). "Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro." Cell **42**(3): 725-736.
- Krajewski, S., M. Krajewska, et al. (1994). "Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression." Cancer Res **54**(21): 5501-5507.
- Krawczak, M., J. Reiss, et al. (1992). "The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences." Hum Genet **90**(1-2): 41-54.
- Kress, T. L., N. J. Krogan, et al. (2008). "A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast." Mol Cell **32**(5): 727-734.
- Kreuzer, K. N. and J. R. Brister (2010). "Initiation of bacteriophage T4 DNA replication and replication fork dynamics: a review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives." Virology **7**: 358.
- Kronfeld, I., G. Kazimirsky, et al. (2000). "Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues regulates specific cellular functions." J Biol Chem **275**(45): 35491-35498.
- Kwan, T., D. Benovoy, et al. (2008). "Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans." Nat Genet **40**(2): 225-231.
- Kwan, T., D. Benovoy, et al. (2007). "Heritability of alternative splicing in the human genome." Genome Res **17**(8): 1210-1218.
- Kwan, T., E. Grundberg, et al. (2009). "Tissue effect on genetic control of transcript isoform variation." PLoS Genet **5**(8): e1000608.
- LaBranche, H., S. Dupuis, et al. (1998). "Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase." Nat Genet **19**(2): 199-202.
- Ladd, A. N., N. Charlet, et al. (2001). "The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing." Mol Cell Biol **21**(4): 1285-1296.
- Lalonde, E., K. C. Ha, et al. (2011). "RNA sequencing reveals the role of splicing polymorphisms in regulating human gene expression." Genome Res **21**(4): 545-554.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Langzam, L., R. Koren, et al. (2001). "Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy." Am J Clin Pathol **116**(3): 377-385.

- Lavigne, A., H. La Branche, et al. (1993). "A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding." Genes Dev **7**(12A): 2405-2417.
- Le Hir, H., E. Izaurralde, et al. (2000). "The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions." EMBO J **19**(24): 6860-6869.
- Lee, J., J. Zhou, et al. (2012). "Identification of a novel cis-element that regulates alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA." Biochem Biophys Res Commun **420**(2): 467-472.
- Lee, J. Y., Y. A. Hannun, et al. (1996). "Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha." J Biol Chem **271**(22): 13169-13174.
- Lee, Y., E. R. Gamazon, et al. (2012). "Variants affecting exon skipping contribute to complex traits." PLoS Genet **8**(10): e1002998.
- Lefebvre, S., L. Burglen, et al. (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." Cell **80**(1): 155-165.
- Lemieux, B., M. Blanchette, et al. (2015). "A Function for the hnRNP A1/A2 Proteins in Transcription Elongation." PLoS One **10**(5): e0126654.
- Leonard, B., S. N. Hart, et al. (2013). "APOBEC3B upregulation and genomic mutation patterns in serous ovarian carcinoma." Cancer Res **73**(24): 7222-7231.
- Letunic, I., R. R. Copley, et al. (2002). "Common exon duplication in animals and its role in alternative splicing." Hum Mol Genet **11**(13): 1561-1567.
- Leu, S., Y. M. Lin, et al. (2012). "Loss of Pnn expression results in mouse early embryonic lethality and cellular apoptosis through SRSF1-mediated alternative expression of Bcl-xS and ICAD." J Cell Sci **125**(Pt 13): 3164-3172.
- Lev-Maor, G., A. Goren, et al. (2007). "The "alternative" choice of constitutive exons throughout evolution." PLoS Genet **3**(11): e203.
- Lev-Maor, G., R. Sorek, et al. (2003). "The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons." Science **300**(5623): 1288-1291.
- Levine, A. and R. Durbin (2001). "A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence." Nucleic Acids Res **29**(19): 4006-4013.
- Lewis, B. P., R. E. Green, et al. (2003). "Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 189-192.
- Li, C., R. I. Lin, et al. (2003). "Nuclear Pnn/DRS protein binds to spliced mRNPs and participates in mRNA processing and export via interaction with RNPS1." Mol Cell Biol **23**(20): 7363-7376.
- Li, C. Y., J. Y. Chu, et al. (2004). "Regulation of alternative splicing of Bcl-x by IL-6, GM-CSF and TPA." Cell Res **14**(6): 473-479.
- Li, H. and P. M. Bingham (1991). "Arginine/serine-rich domains of the su(wa) and tra RNA processing regulators target proteins to a subnuclear compartment implicated in splicing." Cell **67**(2): 335-342.
- Li, X. and J. L. Manley (2005). "Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability." Cell **122**(3): 365-378.
- Li, X., T. Niu, et al. (2007). "The RNA binding protein RNPS1 alleviates ASF/SF2 depletion-induced genomic instability." RNA **13**(12): 2108-2115.
- Licatalosi, D. D., A. Mele, et al. (2008). "HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing." Nature **456**(7221): 464-469.

- Lin, C. H. and J. G. Patton (1995). "Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors." RNA **1**(3): 234-245.
- Lin, Q., S. J. Taylor, et al. (1997). "Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains." J Biol Chem **272**(43): 27274-27280.
- Lin, S., G. Coutinho-Mansfield, et al. (2008). "The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation." Nat Struct Mol Biol **15**(8): 819-826.
- Lin, S. and X. D. Fu (2007). "SR proteins and related factors in alternative splicing." Adv Exp Med Biol **623**: 107-122.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.
- Lindenboim, L., C. Borner, et al. (2001). "Bcl-x(S) can form homodimers and heterodimers and its apoptotic activity requires localization of Bcl-x(S) to the mitochondria and its BH3 and loop domains." Cell Death Differ **8**(9): 933-942.
- Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-1399.
- Liu, J., Y. Xiao, et al. (2012). "Alternative splicing of apoptosis-related genes in imatinib-treated K562 cells identified by exon array analysis." Int J Mol Med **29**(4): 690-698.
- Liu, L. F. and J. C. Wang (1987). "Supercoiling of the DNA template during transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7024-7027.
- Liu, M. and A. Grigoriev (2004). "Protein domains correlate strongly with exons in multiple eukaryotic genomes--evidence of exon shuffling?" Trends Genet **20**(9): 399-403.
- Llorian, M., S. Schwartz, et al. (2010). "Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB." Nat Struct Mol Biol **17**(9): 1114-1123.
- Long, J. C. and J. F. Caceres (2009). "The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression." Biochem J **417**(1): 15-27.
- Long, M., C. Rosenberg, et al. (1995). "Intron phase correlations and the evolution of the intron/exon structure of genes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12495-12499.
- Lopez-Bigas, N., B. Audit, et al. (2005). "Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?" FEBS Lett **579**(9): 1900-1903.
- Lopez de Silanes, I., M. Stagno d'Alcontres, et al. (2010). "TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins." Nat Commun **1**: 33.
- Lovci, M. T., D. Ghanem, et al. (2013). "Rbfox proteins regulate alternative mRNA splicing through evolutionarily conserved RNA bridges." Nat Struct Mol Biol **20**(12): 1434-1442.
- Lu, G. Y., S. M. Huang, et al. (2014). "Caffeine induces tumor cytotoxicity via the regulation of alternative splicing in subsets of cancer-associated genes." Int J Biochem Cell Biol **47**: 83-92.
- Luco, R. F., Q. Pan, et al. (2010). "Regulation of alternative splicing by histone modifications." Science **327**(5968): 996-1000.
- Lukong, K. E., M. E. Huot, et al. (2009). "BRK phosphorylates PSF promoting its cytoplasmic localization and cell cycle arrest." Cell Signal **21**(9): 1415-1422.

- Lukong, K. E., D. Larocque, et al. (2005). "Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression." J Biol Chem **280**(46): 38639-38647.
- Lynch, M. and A. O. Richardson (2002). "The evolution of spliceosomal introns." Curr Opin Genet Dev **12**(6): 701-710.
- Ma, N., S. Matsunaga, et al. (2011). "The nuclear scaffold protein SAF-A is required for kinetochore-microtubule attachment and contributes to the targeting of Aurora-A to mitotic spindles." J Cell Sci **124**(Pt 3): 394-404.
- MacCarthy-Morrogh, L., L. Wood, et al. (2000). "Identification of a novel human BCL-X promoter and exon." Oncogene **19**(48): 5534-5538.
- Maizels, N. (1995). "Somatic hypermutation: how many mechanisms diversify V region sequences?" Cell **83**(1): 9-12.
- Majewski, J. (2003). "Dependence of mutational asymmetry on gene-expression levels in the human genome." Am J Hum Genet **73**(3): 688-692.
- Makarova, O. V., E. M. Makarov, et al. (2001). "The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes." EMBO J **20**(10): 2553-2563.
- Manley, J. L. and A. R. Krainer (2010). "A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins)." Genes Dev **24**(11): 1073-1074.
- Maquat, L. E. (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 89-99.
- Markovtsov, V., J. M. Nikolic, et al. (2000). "Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein." Mol Cell Biol **20**(20): 7463-7479.
- Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, et al. (2007). "hnRNP proteins and splicing control." Adv Exp Med Biol **623**: 123-147.
- Martinez-Contreras, R., J. F. Fisette, et al. (2006). "Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing." PLoS Biol **4**(2): e21.
- Masse, E. and M. Drolet (1999). "Escherichia coli DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling." J Biol Chem **274**(23): 16659-16664.
- Masse, E., P. Phoenix, et al. (1997). "DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in Escherichia coli." J Biol Chem **272**(19): 12816-12823.
- Massiello, A., J. R. Roesser, et al. (2006). "SAP155 Binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA." FASEB J **20**(10): 1680-1682.
- Massiello, A., A. Salas, et al. (2004). "Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide." J Biol Chem **279**(16): 15799-15804.
- Mastrocola, A. S., S. H. Kim, et al. (2013). "The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage." J Biol Chem **288**(34): 24731-24741.
- Matera, A. G. and Z. Wang (2014). "A day in the life of the spliceosome." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 108-121.

- Matsuoka, S., B. A. Ballif, et al. (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." *Science* **316**(5828): 1160-1166.
- Matter, N., P. Herrlich, et al. (2002). "Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68." *Nature* **420**(6916): 691-695.
- Matter, N., M. Marx, et al. (2000). "Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways." *J Biol Chem* **275**(45): 35353-35360.
- Mayeda, A., J. Badolato, et al. (1999). "Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing." *EMBO J* **18**(16): 4560-4570.
- Mayeda, A. and A. R. Krainer (1992). "Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2." *Cell* **68**(2): 365-375.
- Mayeda, A., S. H. Munroe, et al. (1994). "Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins." *EMBO J* **13**(22): 5483-5495.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II." *Genes Dev* **11**(24): 3306-3318.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription." *Nature* **385**(6614): 357-361.
- McCracken, S., E. Rosonina, et al. (1998). "Role of RNA polymerase II carboxy-terminal domain in coordinating transcription with RNA processing." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 301-309.
- McCuaig, R. D., J. Dunn, et al. (2015). "PKC-Theta is a Novel SC35 Splicing Factor Regulator in Response to T Cell Activation." *Front Immunol* **6**: 562.
- Mellor, H. and P. J. Parker (1998). "The extended protein kinase C superfamily." *Biochem J* **332** (Pt 2): 281-292.
- Merdzhanova, G., V. Edmond, et al. (2008). "E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35." *Cell Death Differ* **15**(12): 1815-1823.
- Mermoud, J. E., P. Cohen, et al. (1992). "Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing." *Nucleic Acids Res* **20**(20): 5263-5269.
- Mermoud, J. E., P. T. Cohen, et al. (1994). "Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism." *EMBO J* **13**(23): 5679-5688.
- Michelle, L., A. Cloutier, et al. (2012). "Proteins associated with the exon junction complex also control the alternative splicing of apoptotic regulators." *Mol Cell Biol* **32**(5): 954-967.
- Michlewski, G., J. R. Sanford, et al. (2008). "The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1." *Mol Cell* **30**(2): 179-189.
- Middleton, G., G. Nunez, et al. (1996). "Bax promotes neuronal survival and antagonises the survival effects of neurotrophic factors." *Development* **122**(2): 695-701.
- Miller, L. D., K. C. Lee, et al. (2004). "RACK1 regulates Src-mediated Sam68 and p190RhoGAP signaling." *Oncogene* **23**(33): 5682-5686.
- Minn, A. J., L. H. Boise, et al. (1996). "Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L)." *J Biol Chem* **271**(11): 6306-6312.

- Mischo, H. E., B. Gomez-Gonzalez, et al. (2011). "Yeast Sen1 helicase protects the genome from transcription-associated instability." Mol Cell **41**(1): 21-32.
- Mishra, D. P., R. Pal, et al. (2006). "Changes in cytosolic Ca²⁺ levels regulate Bcl-xS and Bcl-xL expression in spermatogenic cells during apoptotic death." J Biol Chem **281**(4): 2133-2143.
- Misteli, T. (1999). "RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it?" Curr Biol **9**(6): R198-200.
- Misteli, T. and D. L. Spector (1996). "Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors." Mol Biol Cell **7**(10): 1559-1572.
- Monsalve, M., Z. Wu, et al. (2000). "Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1." Mol Cell **6**(2): 307-316.
- Montes, M., A. Cloutier, et al. (2012). "TCERG1 regulates alternative splicing of the Bcl-x gene by modulating the rate of RNA polymerase II transcription." Mol Cell Biol **32**(4): 751-762.
- Montes, M., M. Coiras, et al. (2015). "Functional Consequences for Apoptosis by Transcription Elongation Regulator 1 (TCERG1)-Mediated Bcl-x and Fas/CD95 Alternative Splicing." PLoS One **10**(10): e0139812.
- Moore, M. J., Q. Wang, et al. (2010). "An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis." Cell **142**(4): 625-636.
- Moran, J. V., R. J. DeBerardinis, et al. (1999). "Exon shuffling by L1 retrotransposition." Science **283**(5407): 1530-1534.
- Moreira, A., Y. Takagaki, et al. (1998). "The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms." Genes Dev **12**(16): 2522-2534.
- Motta-Mena, L. B., F. Heyd, et al. (2010). "Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP L." Mol Cell **37**(2): 223-234.
- Moulton, V. R., A. R. Gillooly, et al. (2014). "Ubiquitination regulates expression of the serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) in normal and systemic lupus erythematosus (SLE) T cells." J Biol Chem **289**(7): 4126-4134.
- Municio, M. M., J. Lozano, et al. (1995). "Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta." J Biol Chem **270**(26): 15884-15891.
- Munoz, M. J., M. S. Perez Santangelo, et al. (2009). "DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation." Cell **137**(4): 708-720.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, et al. (2000). "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme." Cell **102**(5): 553-563.
- Muramatsu, M., V. S. Sankaranand, et al. (1999). "Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells." J Biol Chem **274**(26): 18470-18476.
- Nagel, R. J., A. M. Lancaster, et al. (1998). "Specific binding of an exonic splicing enhancer by the pre-mRNA splicing factor SRp55." RNA **4**(1): 11-23.
- Nakahata, S. and S. Kawamoto (2005). "Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities." Nucleic Acids Res **33**(7): 2078-2089.

- Naro, C., F. Barbagallo, et al. (2014). "The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival." *Nucleic Acids Res* **42**(5): 3218-3227.
- Nasim, F. U., S. Hutchison, et al. (2002). "High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism." *RNA* **8**(8): 1078-1089.
- Nayler, O., S. Stamm, et al. (1997). "Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases." *Biochem J* **326** (Pt 3): 693-700.
- Nekrutenko, A. and W. H. Li (2001). "Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes." *Trends Genet* **17**(11): 619-621.
- Nembaware, V., K. H. Wolfe, et al. (2004). "Allele-specific transcript isoforms in human." *FEBS Lett* **577**(1-2): 233-238.
- Neuberger, M. S., R. S. Harris, et al. (2003). "Immunity through DNA deamination." *Trends Biochem Sci* **28**(6): 305-312.
- Neuenkirchen, N., A. Chari, et al. (2008). "Deciphering the assembly pathway of Sm-class U snRNPs." *FEBS Lett* **582**(14): 1997-2003.
- Neumann, M., D. M. Sampathu, et al. (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Science* **314**(5796): 130-133.
- Neviani, P., R. Santhanam, et al. (2005). "The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein." *Cancer Cell* **8**(5): 355-368.
- Newman, A. (1987). "Specific accessory sequences in *Saccharomyces cerevisiae* introns control assembly of pre-mRNAs into spliceosomes." *EMBO J* **6**(12): 3833-3839.
- Ngan, C. Y., H. Yamamoto, et al. (2008). "Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells." *Cancer Sci* **99**(1): 129-139.
- Nilsen, T. W. and B. R. Graveley (2010). "Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing." *Nature* **463**(7280): 457-463.
- Nogues, G., S. Kadener, et al. (2002). "Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing." *J Biol Chem* **277**(45): 43110-43114.
- Nogues, G., M. J. Munoz, et al. (2003). "Influence of polymerase II processivity on alternative splicing depends on splice site strength." *J Biol Chem* **278**(52): 52166-52171.
- Nollmann, M., N. J. Crisona, et al. (2007). "Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: from in vivo function to single-molecule mechanism." *Biochimie* **89**(4): 490-499.
- Okamoto, Y., H. Onogi, et al. (1998). "cdc2 kinase-mediated phosphorylation of splicing factor SF2/ASF." *Biochem Biophys Res Commun* **249**(3): 872-878.
- Olson, S., M. Blanchette, et al. (2007). "A regulator of Dscam mutually exclusive splicing fidelity." *Nat Struct Mol Biol* **14**(12): 1134-1140.
- Opferman, J. T. and S. J. Korsmeyer (2003). "Apoptosis in the development and maintenance of the immune system." *Nat Immunol* **4**(5): 410-415.
- Ostareck-Lederer, A., D. H. Ostareck, et al. (1998). "Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2." *Trends Biochem Sci* **23**(11): 409-411.
- Ostareck, D. H., A. Ostareck-Lederer, et al. (1997). "mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end." *Cell* **89**(4): 597-606.

- Pagliarini, V., L. Pelosi, et al. (2015). "SAM68 is a physiological regulator of SMN2 splicing in spinal muscular atrophy." *J Cell Biol* **211**(1): 77-90.
- Pan, Q., O. Shai, et al. (2008). "Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing." *Nat Genet* **40**(12): 1413-1415.
- Pandit, S., Y. Zhou, et al. (2013). "Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing." *Mol Cell* **50**(2): 223-235.
- Pang, A. W., J. R. MacDonald, et al. (2010). "Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome." *Genome Biol* **11**(5): R52.
- Pardo, O. E., A. Arcaro, et al. (2002). "Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis." *J Biol Chem* **277**(14): 12040-12046.
- Pardo, O. E., C. Wellbrock, et al. (2006). "FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2." *EMBO J* **25**(13): 3078-3088.
- Park, C., W. Qian, et al. (2012). "Genomic evidence for elevated mutation rates in highly expressed genes." *EMBO Rep* **13**(12): 1123-1129.
- Paronetto, M. P., T. Achsel, et al. (2007). "The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x." *J Cell Biol* **176**(7): 929-939.
- Paronetto, M. P., I. Bernardis, et al. (2014). "Regulation of FAS exon definition and apoptosis by the Ewing sarcoma protein." *Cell Rep* **7**(4): 1211-1226.
- Paronetto, M. P., D. Farini, et al. (2004). "Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer." *Am J Pathol* **164**(4): 1243-1251.
- Paronetto, M. P., B. Minana, et al. (2011). "The Ewing sarcoma protein regulates DNA damage-induced alternative splicing." *Mol Cell* **43**(3): 353-368.
- Patry, C., L. Bouchard, et al. (2003). "Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticle A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines." *Cancer Res* **63**(22): 7679-7688.
- Paulsen, R. D., D. V. Soni, et al. (2009). "A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability." *Mol Cell* **35**(2): 228-239.
- Pearson, J. L., T. J. Robinson, et al. (2008). "Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing." *J Biol Chem* **283**(12): 7949-7961.
- Pecci, A., A. Scholz, et al. (1997). "Progestins prevent apoptosis in a rat endometrial cell line and increase the ratio of bcl-XL to bcl-XS." *J Biol Chem* **272**(18): 11791-11798.
- Pecci, A., L. R. Viegas, et al. (2001). "Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene." *J Biol Chem* **276**(24): 21062-21069.
- Pedrotti, S., P. Bielli, et al. (2010). "The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy." *EMBO J* **29**(7): 1235-1247.
- Pedrotti, S., R. Busa, et al. (2012). "The RNA recognition motif protein RBM11 is a novel tissue-specific splicing regulator." *Nucleic Acids Res* **40**(3): 1021-1032.

- Petersen-Mahrt, S. K., R. S. Harris, et al. (2002). "AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification." *Nature* **418**(6893): 99-103.
- Pham, P., R. Bransteitter, et al. (2003). "Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation." *Nature* **424**(6944): 103-107.
- Phillips, D. D., D. N. Garboczi, et al. (2013). "The sub-nanomolar binding of DNA-RNA hybrids by the single-chain Fv fragment of antibody S9.6." *J Mol Recognit* **26**(8): 376-381.
- Phoenix, P., M. A. Raymond, et al. (1997). "Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation in vitro." *J Biol Chem* **272**(3): 1473-1479.
- Pickrell, J. K., J. C. Marioni, et al. (2010). "Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing." *Nature* **464**(7289): 768-772.
- Pino, I., R. Pio, et al. (2003). "Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer." *Lung Cancer* **41**(2): 131-143.
- Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss (1992). "Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm." *Nature* **355**(6362): 730-732.
- Piruat, J. I. and A. Aguilera (1998). "A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination." *EMBO J* **17**(16): 4859-4872.
- Pollock, A. S., J. Turck, et al. (2003). "The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells." *FASEB J* **17**(2): 203-213.
- Polydorides, A. D., H. J. Okano, et al. (2000). "A brain-enriched polypyrimidine tract-binding protein antagonizes the ability of Nova to regulate neuron-specific alternative splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6350-6355.
- Polymenidou, M., C. Lagier-Tourenne, et al. (2011). "Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43." *Nat Neurosci* **14**(4): 459-468.
- Ponta, H., L. Sherman, et al. (2003). "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(1): 33-45.
- Prado, F. and A. Aguilera (2005). "Impairment of replication fork progression mediates RNA polII transcription-associated recombination." *EMBO J* **24**(6): 1267-1276.
- Prasad, J., K. Colwill, et al. (1999). "The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing." *Mol Cell Biol* **19**(10): 6991-7000.
- Puig, O., E. Bragado-Nilsson, et al. (2007). "The U1 snRNP-associated factor Luc7p affects 5' splice site selection in yeast and human." *Nucleic Acids Res* **35**(17): 5874-5885.
- Rajagopalan, L. E., C. J. Westmark, et al. (1998). "hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA." *Nucleic Acids Res* **26**(14): 3418-3423.
- Reinhold, W. C., M. Sunshine, et al. (2012). "CellMiner: a web-based suite of genomic and pharmacologic tools to explore transcript and drug patterns in the NCI-60 cell line set." *Cancer Res* **72**(14): 3499-3511.
- Renshaw, S. A., C. E. Dempsey, et al. (2004). "Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene." *J Biol Chem* **279**(4): 2846-2855.

- Revil, T., J. Pelletier, et al. (2009). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform." *J Biol Chem* **284**(32): 21458-21467.
- Revil, T., J. Toutant, et al. (2007). "Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing." *Mol Cell Biol* **27**(24): 8431-8441.
- Ribeyre, C., J. Lopes, et al. (2009). "The yeast Pif1 helicase prevents genomic instability caused by G-quadruplex-forming CEB1 sequences in vivo." *PLoS Genet* **5**(5): e1000475.
- Richard, S., D. Yu, et al. (1995). "Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1." *Mol Cell Biol* **15**(1): 186-197.
- Risso, G., F. Pelisch, et al. (2013). "Modification of Akt by SUMO conjugation regulates alternative splicing and cell cycle." *Cell Cycle* **12**(19): 3165-3174.
- Robbiani, D. F. and M. C. Nussenzweig (2013). "Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase." *Annu Rev Pathol* **8**: 79-103.
- Roberts, G. C., C. Gooding, et al. (1998). "Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection." *Nucleic Acids Res* **26**(24): 5568-5572.
- Roberts, R. W. and D. M. Crothers (1992). "Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition." *Science* **258**(5087): 1463-1466.
- Robson-Dixon, N. D. and M. A. Garcia-Blanco (2004). "MAZ elements alter transcription elongation and silencing of the fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIb." *J Biol Chem* **279**(28): 29075-29084.
- Rocha-Viegas, L., G. P. Vicent, et al. (2006). "Glucocorticoids repress bcl-X expression in lymphoid cells by recruiting STAT5B to the P4 promoter." *J Biol Chem* **281**(45): 33959-33970.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868.
- Rohrbach, S., U. Muller-Werdan, et al. (2005). "Apoptosis-modulating interaction of the neuregulin/erbB pathway with anthracyclines in regulating Bcl-xS and Bcl-xL in cardiomyocytes." *J Mol Cell Cardiol* **38**(3): 485-493.
- Rohrbach, S., B. Niemann, et al. (2005). "Neuregulin receptors erbB2 and erbB4 in failing human myocardium -- depressed expression and attenuated activation." *Basic Res Cardiol* **100**(3): 240-249.
- Ron, D., E. W. Napolitano, et al. (1999). "Direct interaction in T-cells between thetaPKC and the tyrosine kinase p59fyn." *J Biol Chem* **274**(27): 19003-19010.
- Roscigno, R. F. and M. A. Garcia-Blanco (1995). "SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome." *RNA* **1**(7): 692-706.
- Rosenberger, S., J. De-Castro Arce, et al. (2010). "Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(15): 7006-7011.
- Rossi, F., E. Labourier, et al. (1996). "Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I." *Nature* **381**(6577): 80-82.
- Roth, M. B., A. M. Zahler, et al. (1991). "A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription." *J Cell Biol* **115**(3): 587-596.

- Roy, D. and M. R. Lieber (2009). "G clustering is important for the initiation of transcription-induced R-loops in vitro, whereas high G density without clustering is sufficient thereafter." *Mol Cell Biol* **29**(11): 3124-3133.
- Roy, D., K. Yu, et al. (2008). "Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences." *Mol Cell Biol* **28**(1): 50-60.
- Roy, D., Z. Zhang, et al. (2010). "Competition between the RNA transcript and the nontemplate DNA strand during R-loop formation in vitro: a nick can serve as a strong R-loop initiation site." *Mol Cell Biol* **30**(1): 146-159.
- Roy, R., D. Durie, et al. (2014). "hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling." *Nucleic Acids Res* **42**(20): 12483-12497.
- Ruegg, U. T. and G. M. Burgess (1989). "Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases." *Trends Pharmacol Sci* **10**(6): 218-220.
- Ruiz, J. F., B. Gomez-Gonzalez, et al. (2011). "AID induces double-strand breaks at immunoglobulin switch regions and c-MYC causing chromosomal translocations in yeast THO mutants." *PLoS Genet* **7**(2): e1002009.
- Sakashita, E., S. Tatsumi, et al. (2004). "Human RNPS1 and its associated factors: a versatile alternative pre-mRNA splicing regulator in vivo." *Mol Cell Biol* **24**(3): 1174-1187.
- Samejima, K., P. A. Svingen, et al. (1999). "Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis." *J Biol Chem* **274**(7): 4335-4340.
- Sanders, C. M. (2010). "Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity." *Biochem J* **430**(1): 119-128.
- Sanford, J. R., N. K. Gray, et al. (2004). "A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation." *Genes Dev* **18**(7): 755-768.
- Santos-Pereira, J. M., A. B. Herrero, et al. (2013). "The Npl3 hnRNP prevents R-loop-mediated transcription-replication conflicts and genome instability." *Genes Dev* **27**(22): 2445-2458.
- Sato, T., M. Hanada, et al. (1994). "Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9238-9242.
- Sazani, P. and R. Kole (2003). "Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing." *J Clin Invest* **112**(4): 481-486.
- Schmitt, E., C. Paquet, et al. (2004). "Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation." *Oncogene* **23**(22): 3915-3931.
- Schmucker, D., J. C. Clemens, et al. (2000). "Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity." *Cell* **101**(6): 671-684.
- Schor, I. E., N. Rascovan, et al. (2009). "Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(11): 4325-4330.
- Schullery, D. S., J. Ostrowski, et al. (1999). "Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein." *J Biol Chem* **274**(21): 15101-15109.
- Schwartz, S., E. Meshorer, et al. (2009). "Chromatin organization marks exon-intron structure." *Nat Struct Mol Biol* **16**(9): 990-995.

- Schwerk, C., J. Prasad, et al. (2003). "ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis." *Mol Cell Biol* **23**(8): 2981-2990.
- Schwerk, C. and K. Schulze-Osthoff (2005). "Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing." *Mol Cell* **19**(1): 1-13.
- Screaton, G. R., J. F. Caceres, et al. (1995). "Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors." *EMBO J* **14**(17): 4336-4349.
- Seol, D. W. and T. R. Billiar (1999). "A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis." *J Biol Chem* **274**(4): 2072-2076.
- Sephton, C. F., C. Cenik, et al. (2011). "Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes." *J Biol Chem* **286**(2): 1204-1215.
- Sharma, S., A. M. Falick, et al. (2005). "Polypyrimidine tract binding protein blocks the 5' splice site-dependent assembly of U2AF and the prespliceosomal E complex." *Mol Cell* **19**(4): 485-496.
- Shen, H. and M. R. Green (2006). "RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans." *Genes Dev* **20**(13): 1755-1765.
- Sheth, N., X. Roca, et al. (2006). "Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics." *Nucleic Acids Res* **34**(14): 3955-3967.
- Shi, Y. and J. L. Manley (2007). "A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock." *Mol Cell* **28**(1): 79-90.
- Shimada, N., I. Rios, et al. (2009). "p38 MAP kinase-dependent regulation of the expression level and subcellular distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and its involvement in cellular senescence in normal human fibroblasts." *RNA Biol* **6**(3): 293-304.
- Shin, C., Y. Feng, et al. (2004). "Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock." *Nature* **427**(6974): 553-558.
- Shin, C. and J. L. Manley (2002). "The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells." *Cell* **111**(3): 407-417.
- Shiraiwa, N., N. Inohara, et al. (1996). "An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells." *J Biol Chem* **271**(22): 13258-13265.
- Shkreta, L. and B. Chabot (2015). "The RNA Splicing Response to DNA Damage." *Biomolecules* **5**(4): 2935-2977.
- Shkreta, L., U. Froehlich, et al. (2008). "Anticancer drugs affect the alternative splicing of Bcl-x and other human apoptotic genes." *Mol Cancer Ther* **7**(6): 1398-1409.
- Shkreta, L., L. Michelle, et al. (2011). "The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x." *J Biol Chem* **286**(1): 331-340.
- Shkreta, L., J. Toutant, et al. (2016). "SRSF10 Connects DNA Damage to the Alternative Splicing of Transcripts Encoding Apoptosis, Cell-Cycle Control, and DNA Repair Factors." *Cell Rep* **17**(8): 1990-2003.
- Shultz, J. C., N. Vu, et al. (2012). "The Proto-oncogene PKC η regulates the alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA." *Mol Cancer Res* **10**(5): 660-669.
- Singh, J. and R. A. Padgett (2009). "Rates of in situ transcription and splicing in large human genes." *Nat Struct Mol Biol* **16**(11): 1128-1133.

- Singh, R., S. C. Gupta, et al. (2016). "Regulation of alternative splicing of Bcl-x by BC200 contributes to breast cancer pathogenesis." *Cell Death Dis* **7**(6): e2262.
- Sisodia, S. S., B. Sollner-Webb, et al. (1987). "Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation." *Mol Cell Biol* **7**(10): 3602-3612.
- Skandalis, A., B. N. Ford, et al. (1994). "Strand bias in mutation involving 5-methylcytosine deamination in the human hprt gene." *Mutat Res* **314**(1): 21-26.
- Skourti-Stathaki, K. and N. J. Proudfoot (2014). "A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression." *Genes Dev* **28**(13): 1384-1396.
- Skourti-Stathaki, K., N. J. Proudfoot, et al. (2011). "Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination." *Mol Cell* **42**(6): 794-805.
- Smale, S. T. and R. Tjian (1985). "Transcription of herpes simplex virus tk sequences under the control of wild-type and mutant human RNA polymerase I promoters." *Mol Cell Biol* **5**(2): 352-362.
- Smith, C. W. and J. Valcarcel (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." *Trends Biochem Sci* **25**(8): 381-388.
- Sollier, J., C. T. Stork, et al. (2014). "Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability." *Mol Cell* **56**(6): 777-785.
- Solnick, D. and S. I. Lee (1987). "Amount of RNA secondary structure required to induce an alternative splice." *Mol Cell Biol* **7**(9): 3194-3198.
- Son, K., S. Fujioka, et al. (2009). "Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells." *Anticancer Res* **29**(10): 3995-4003.
- Sorek, R., G. Ast, et al. (2002). "Alu-containing exons are alternatively spliced." *Genome Res* **12**(7): 1060-1067.
- Sorek, R., G. Lev-Maor, et al. (2004). "Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 5' splice site formation in alu exons." *Mol Cell* **14**(2): 221-231.
- Southby, J., C. Gooding, et al. (1999). "Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons." *Mol Cell Biol* **19**(4): 2699-2711.
- Spector, D. L. and A. I. Lamond (2011). "Nuclear speckles." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(2).
- Stirling, P. C., Y. A. Chan, et al. (2012). "R-loop-mediated genome instability in mRNA cleavage and polyadenylation mutants." *Genes Dev* **26**(2): 163-175.
- Stokes, M. P., J. Rush, et al. (2007). "Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19855-19860.
- Strasser, A., L. O'Connor, et al. (2000). "Apoptosis signaling." *Annu Rev Biochem* **69**: 217-245.
- Stumm, G., J. Schlegel, et al. (1999). "Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons." *FASEB J* **13**(9): 1065-1072.
- Sugimoto, N., S. Nakano, et al. (1995). "Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes." *Biochemistry* **34**(35): 11211-11216.
- Sumantran, V. N., M. W. Ealovega, et al. (1995). "Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* **55**(12): 2507-2510.
- Sun, H. and L. A. Chasin (2000). "Multiple splicing defects in an intronic false exon." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6414-6425.

- Sun, H., A. Yabuki, et al. (2001). "A human nuclease specific for G4 DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12444-12449.
- Sun, Q., A. Mayeda, et al. (1993). "General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer." Genes Dev **7**(12B): 2598-2608.
- Swartz, J. E., Y. C. Bor, et al. (2007). "The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element." J Biol Chem **282**(27): 19844-19853.
- Tacke, R., Y. Chen, et al. (1997). "Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1148-1153.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-632.
- Takahama, K., A. Takada, et al. (2013). "Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS." Chem Biol **20**(3): 341-350.
- Tange, T. O., A. Nott, et al. (2004). "The ever-increasing complexities of the exon junction complex." Curr Opin Cell Biol **16**(3): 279-284.
- Tanuma, N., S. E. Kim, et al. (2008). "Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP1) directs protein phosphatase-1 (PP1) to dephosphorylate the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155)." J Biol Chem **283**(51): 35805-35814.
- Tate, S. K., C. Depondt, et al. (2005). "Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(15): 5507-5512.
- Taylor, J. K., Q. Q. Zhang, et al. (1999). "Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides." Nat Biotechnol **17**(11): 1097-1100.
- Taylor, S. J. and D. Shalloway (1994). "An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis." Nature **368**(6474): 867-871.
- Tazi, J., M. C. Daugeron, et al. (1992). "Adenosine phosphorothioates (ATP alpha S and ATP tau S) differentially affect the two steps of mammalian pre-mRNA splicing." J Biol Chem **267**(7): 4322-4326.
- Tazi, J., U. Kornstadt, et al. (1993). "Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing." Nature **363**(6426): 283-286.
- Teraoka, S. N., M. Telatar, et al. (1999). "Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences." Am J Hum Genet **64**(6): 1617-1631.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-1316.
- Tilgner, H., C. Nikolaou, et al. (2009). "Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition." Nat Struct Mol Biol **16**(9): 996-1001.
- Tollervy, J. R., T. Curk, et al. (2011). "Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43." Nat Neurosci **14**(4): 452-458.
- Tseng, C. K. and S. C. Cheng (2008). "Both catalytic steps of nuclear pre-mRNA splicing are reversible." Science **320**(5884): 1782-1784.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228**(4706): 1440-1443.

- Tuduri, S., L. Crabbe, et al. (2009). "Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription." Nat Cell Biol **11**(11): 1315-1324.
- Turunen, J. J., E. H. Niemela, et al. (2013). "The significant other: splicing by the minor spliceosome." Wiley Interdiscip Rev RNA **4**(1): 61-76.
- Ule, J., G. Stefani, et al. (2006). "An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation." Nature **444**(7119): 580-586.
- Underwood, J. G., P. L. Boutz, et al. (2005). "Homologues of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals." Mol Cell Biol **25**(22): 10005-10016.
- Utz, P. J., M. Hottelet, et al. (1998). "Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death." J Exp Med **187**(4): 547-560.
- Valadkhan, S., A. Mohammadi, et al. (2009). "Protein-free small nuclear RNAs catalyze a two-step splicing reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(29): 11901-11906.
- Valadkhan, S., A. Mohammadi, et al. (2007). "Protein-free spliceosomal snRNAs catalyze a reaction that resembles the first step of splicing." RNA **13**(12): 2300-2311.
- van der Houven van Oordt, W., M. T. Diaz-Meco, et al. (2000). "The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation." J Cell Biol **149**(2): 307-316.
- van Hemert, M. J., H. Y. Steensma, et al. (2001). "14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis." Bioessays **23**(10): 936-946.
- van Rijk, A. and H. Bloemendal (2003). "Molecular mechanisms of exon shuffling: illegitimate recombination." Genetica **118**(2-3): 245-249.
- Varga, A., G. Czifra, et al. (2004). "Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas." Eur Urol **46**(4): 462-465.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-442.
- Venables, J. P., R. Klinck, et al. (2008). "Identification of alternative splicing markers for breast cancer." Cancer Res **68**(22): 9525-9531.
- Venables, J. P., R. Klinck, et al. (2009). "Cancer-associated regulation of alternative splicing." Nat Struct Mol Biol **16**(6): 670-676.
- Venables, J. P., C. S. Koh, et al. (2008). "Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins." Mol Cell Biol **28**(19): 6033-6043.
- Vergnaud, G. and F. Denoeud (2000). "Minisatellites: mutability and genome architecture." Genome Res **10**(7): 899-907.
- Vicent, G. P., A. Pecci, et al. (2002). "Differences in nuclear retention characteristics of agonist-activated glucocorticoid receptor may determine specific responses." Exp Cell Res **276**(2): 142-154.
- Viegas, L. R., G. P. Vicent, et al. (2004). "Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4." J Biol Chem **279**(11): 9831-9839.
- Villemaire, J., I. Dion, et al. (2003). "Reprogramming alternative pre-messenger RNA splicing through the use of protein-binding antisense oligonucleotides." J Biol Chem **278**(50): 50031-50039.
- Vincent, M., P. Lauriault, et al. (1996). "The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes." Nucleic Acids Res **24**(23): 4649-4652.

- Wagner, E. J. and M. A. Garcia-Blanco (2001). "Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition." Mol Cell Biol **21**(10): 3281-3288.
- Wahba, L., J. D. Amon, et al. (2011). "RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability." Mol Cell **44**(6): 978-988.
- Wahl, M. C., C. L. Will, et al. (2009). "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." Cell **136**(4): 701-718.
- Wang, E. T., R. Sandberg, et al. (2008). "Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes." Nature **456**(7221): 470-476.
- Wang, F., K. J. Soprano, et al. (2015). "Role of Acinus in regulating retinoic acid-responsive gene pre-mRNA splicing." J Cell Physiol **230**(4): 791-801.
- Wang, H. Y., W. Lin, et al. (1998). "SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells." J Cell Biol **140**(4): 737-750.
- Wang, K., X. M. Yin, et al. (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." Genes Dev **10**(22): 2859-2869.
- Wang, L., M. Miura, et al. (1994). "Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death." Cell **78**(5): 739-750.
- Wang, L. L., S. Richard, et al. (1995). "P62 association with RNA is regulated by tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **270**(5): 2010-2013.
- Wang, P., P. J. Lou, et al. (2002). "Modulation of alternative pre-mRNA splicing in vivo by pinin." Biochem Biophys Res Commun **294**(2): 448-455.
- Wang, Q. and P. A. Silver (2010). "Genome-wide RNAi screen discovers functional coupling of alternative splicing and cell cycle control to apoptosis regulation." Cell Cycle **9**(22): 4419-4421.
- Wang, W. Y., L. Pan, et al. (2013). "Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons." Nat Neurosci **16**(10): 1383-1391.
- Wang, Y., D. Chen, et al. (2014). "The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression." Cancer Cell **26**(3): 374-389.
- Wang, Z. and C. B. Burge (2008). "Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code." RNA **14**(5): 802-813.
- Wang, Z., H. M. Hoffmann, et al. (1995). "Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity." RNA **1**(1): 21-35.
- Warzecha, C. C., T. K. Sato, et al. (2009). "ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing." Mol Cell **33**(5): 591-601.
- Waterhouse, N., S. Kumar, et al. (1996). "Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases in apoptosis." J Biol Chem **271**(46): 29335-29341.
- Weg-Remers, S., H. Ponta, et al. (2001). "Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway." EMBO J **20**(15): 4194-4203.
- Wellinger, R. E., F. Prado, et al. (2006). "Replication fork progression is impaired by transcription in hyperrecombinant yeast cells lacking a functional THO complex." Mol Cell Biol **26**(8): 3327-3334.
- Westover, K. D., D. A. Bushnell, et al. (2004). "Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II." Science **303**(5660): 1014-1016.

- Will, C. L. and R. Luhrmann (2011). "Spliceosome structure and function." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(7).
- Wongsurawat, T., P. Jenjaroenpun, et al. (2012). "Quantitative model of R-loop forming structures reveals a novel level of RNA-DNA interactome complexity." Nucleic Acids Res **40**(2): e16.
- Wood, V., R. Gwilliam, et al. (2002). "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*." Nature **415**(6874): 871-880.
- Wu, J. Y. and T. Maniatis (1993). "Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing." Cell **75**(6): 1061-1070.
- Xiao, Q., A. L. Ford, et al. (2012). "Bcl-x pre-mRNA splicing regulates brain injury after neonatal hypoxia-ischemia." J Neurosci **32**(39): 13587-13596.
- Xiao, R., Y. Sun, et al. (2007). "Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis." Mol Cell Biol **27**(15): 5393-5402.
- Xiao, S., T. Sanelli, et al. (2011). "RNA targets of TDP-43 identified by UV-CLIP are deregulated in ALS." Mol Cell Neurosci **47**(3): 167-180.
- Xiao, S. H. and J. L. Manley (1997). "Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing." Genes Dev **11**(3): 334-344.
- Xiao, S. H. and J. L. Manley (1998). "Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2." EMBO J **17**(21): 6359-6367.
- Xu, B. and D. A. Clayton (1996). "RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers." EMBO J **15**(12): 3135-3143.
- Xu, L., B. Gorham, et al. (1993). "Replacement of germ-line epsilon promoter by gene targeting alters control of immunoglobulin heavy chain class switching." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3705-3709.
- Xu, X., H. D. Joh, et al. (2001). "Expression of multiple larger-sized transcripts for several genes in oligodendrogliomas: potential markers for glioma subtype." Cancer Lett **171**(1): 67-77.
- Xue, Y., Y. Zhou, et al. (2009). "Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping." Mol Cell **36**(6): 996-1006.
- Yamada, M., M. Mizuguchi, et al. (2000). "Localization of Bcl-xbeta in the developing and adult rat central nervous system." J Neurosci Res **60**(4): 468-477.
- Yang, H., M. R. Sadda, et al. (2004). "S-adenosylmethionine and its metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S)." Hepatology **40**(1): 221-231.
- Yang, X., M. R. Bani, et al. (1994). "The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 6924-6928.
- Yang, X. F., G. F. Weber, et al. (1997). "A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells." Immunity **7**(5): 629-639.
- Yang, X. F., Q. Ye, et al. (2002). "Analysis of the complex genomic structure of Bcl-x and its relationship to Bcl-x(gamma) expression after CD28-dependent costimulation." Mol Immunol **39**(1-2): 45-55.

- Yang, Y., L. Zhan, et al. (2011). "RNA secondary structure in mutually exclusive splicing." Nat Struct Mol Biol **18**(2): 159-168.
- Ye, Q., B. Press, et al. (2002). "T cell costimulation through CD28 depends on induction of the Bcl-xgamma isoform: analysis of Bcl-xgamma-deficient mice." J Exp Med **196**(1): 87-95.
- Yeo, G., D. Holste, et al. (2004). "Variation in alternative splicing across human tissues." Genome Biol **5**(10): R74.
- Yeo, G. W., N. G. Coufal, et al. (2009). "An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 130-137.
- Yi, X. P., J. Zhou, et al. (2006). "Nuclear compartmentalization of FAK and FRNK in cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(6): H2509-2515.
- Yin, X. M., K. Wang, et al. (1999). "Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis." Nature **400**(6747): 886-891.
- Yost, H. J. and S. Lindquist (1986). "RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis." Cell **45**(2): 185-193.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.
- Yu, K., F. Chedin, et al. (2003). "R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells." Nat Immunol **4**(5): 442-451.
- Yu, K., D. Roy, et al. (2005). "Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops." Mol Cell Biol **25**(5): 1730-1736.
- Zachar, Z., T. B. Chou, et al. (1987). "Evidence that a regulatory gene autoregulates splicing of its transcript." EMBO J **6**(13): 4105-4111.
- Zahler, A. M., C. K. Damgaard, et al. (2004). "SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulate HIV-1 tat exon 2 splicing." J Biol Chem **279**(11): 10077-10084.
- Zhang, C., Z. Zhang, et al. (2008). "Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2." Genes Dev **22**(18): 2550-2563.
- Zhang, Q. S., L. Manche, et al. (2006). "hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity." RNA **12**(6): 1116-1128.
- Zhang, W., S. Duan, et al. (2009). "Identification of common genetic variants that account for transcript isoform variation between human populations." Hum Genet **125**(1): 81-93.
- Zhang, X. H. and L. A. Chasin (2006). "Comparison of multiple vertebrate genomes reveals the birth and evolution of human exons." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(36): 13427-13432.
- Zhang, X. H., C. S. Leslie, et al. (2005). "Dichotomous splicing signals in exon flanks." Genome Res **15**(6): 768-779.
- Zhang, Z. and A. R. Krainer (2004). "Involvement of SR proteins in mRNA surveillance." Mol Cell **16**(4): 597-607.
- Zhang, Z. Z., N. R. Pannunzio, et al. (2015). "Complexities due to single-stranded RNA during antibody detection of genomic rna:dna hybrids." BMC Res Notes **8**: 127.
- Zhou, A., A. C. Ou, et al. (2008). "Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection." Mol Cell Biol **28**(19): 5924-5936.

- Zhou, H. L., C. Geng, et al. (2013). "The p97-UBXD8 complex destabilizes mRNA by promoting release of ubiquitinated HuR from mRNP." Genes Dev **27**(9): 1046-1058.
- Zhou, H. L., M. N. Hinman, et al. (2011). "Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(36): E627-635.
- Zhu, B. H., Y. Y. Guan, et al. (1999). "Erigeron breviscapus prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta." Life Sci **65**(15): 1553-1559.
- Zhu, H., R. A. Hasman, et al. (2006). "A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators." Mol Biol Cell **17**(12): 5105-5114.
- Zhu, J., A. Mayeda, et al. (2001). "Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins." Mol Cell **8**(6): 1351-1361.
- Zhuo, D., R. Madden, et al. (2007). "Modern origin of numerous alternatively spliced human introns from tandem arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 882-886.